

**Durchflusszytometrische Beurteilung der quantitativen
Verteilung endothelialer Stammzellen
in Abhängigkeit von
dem Schweregrad der Herzinsuffizienz**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Marlen Fabris

geboren am 17.07.1983 in Gotha

Gutachter: 1. Prof. Dr. D. Barz, Universitätsklinikum der FSU Jena
 2. Prof. Dr. G. Wolf, Universitätsklinikum der FSU Jena
 3. PD Dr. Th. Tonn, Klinikum der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt a.M.

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03. November 2009

Abkürzungsverzeichnis

Ac-LDL	Acetyliertes Low-density Lipoprotein
BMI	Body Mass Index
BNP	Natriuretisches Peptid Typ B
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
CrP	Capsel-reaktives Protein
CSE	Cholesterol Synthese Enzym
CXCR4	CXC Chemokin Rezeptor 4 (Rezeptor für SDF-1)
DCM	Dilatative Cardiomyopathie
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetate (Äthylendiamintetraessigsäure)
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	Endothelial Progenitor Cells (Endotheliale Vorläuferzellen)
EPO	Erythropoietin
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein Isocyanate
Flk-1	Fetal liver kinase-1
FSC	Forward scatter
G-CSF	Granulozyte colony-stimulating factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min)
HIF-1	Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor-1
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSC	Hämatopoietische Stammzellen
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
KDR	Kinase Insert Domain Rezeptor
KHK	Koronare Herzerkrankung
L	Liter
LDL	Low density lipoprotein

LPS	Lipopolysaccharid
LVAD	Left ventricular assist device
LYM	Lymphozyten
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate bufferd saline
PCI	Perkutane koronare Intervention
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
Per-CP	Peridin-Chlorophyll-a-Proteinkomplexe
Sca-1	Muriner Stammzellmarker-1
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SI	Système International d'Unités (internationales System der Einheiten)
SSC	Side scatter
STAT ₃	Signal transducer and activator of transcription ₃
sTNFR1	Löslicher TNF- α -Rezeptor 1
sTNFR2	Löslicher TNF- α -Rezeptor 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNFR2/p75	TNF- α -Rezeptor 2/p75
VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor-2
VPF	Vascular permeability factor
vWF	Von Willebrand Faktor
WBC	White blood cells

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **I**

INHALTSVERZEICHNIS **III**

1 ZUSAMMENFASSUNG **1**

2 EINLEITUNG **3**

2.1 ÜBERBLICK ÜBER DAS ERKRANKUNGSBILD DER HERZINSUFFIZIENZ 3

2.1.1 DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE 3

2.1.2 ÄTIOLOGIE UND RISIKOFAKTOREN 3

2.1.3 FORMEN DER HERZINSUFFIZIENZ 4

2.1.4 SCHWEREGRADEINTEILUNG DER HERZINSUFFIZIENZ 6

2.2 DIE OBERFLÄCHENANTIGENE DER ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN. 7

2.2.1 DAS OBERFLÄCHENANTIGEN CD34 7

2.2.2 DAS OBERFLÄCHENANTIGEN CD133 8

2.2.3 VEGF UND DAS OBERFLÄCHENANTIGEN VEGFR-2 9

2.2.4 CHARAKTERISTIKA DER ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN 10

3 FRAGESTELLUNG **13**

4 PATIENTEN UND METHODEN **15**

4.1 PATIENTEN- UND KONTROLLGRUPPE.....15

4.1.1 PATIENTENKOLLEKTIV 15

4.1.2 KONTROLLKOLLEKTIV 16

4.2 MATERIALIEN UND GERÄTE.....17

4.2.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN 17

4.2.2 VERWENDETE GERÄTE 18

4.2.3	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	19
4.2.4	VERWENDETE ANTIKÖRPER UND SEKUNDÄRREAGENZIEN	20
4.2.5	ERLÄUTERUNG DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE ANHAND DES FACS CALIBUR™	22
4.3	EXPERIMENTELLE METHODEN.....	27
4.3.1	HERSTELLUNG VERWENDETER LÖSUNGEN	27
4.3.1.1	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung, PBS)	27
4.3.1.2	FACS Lysing Solution (Lyselösung)	27
4.3.2	GEWINNUNG DER BLUTPROBEN	27
4.3.3	ERSTELLUNG DES DIFFERENTIALBLUTBILDES	28
4.3.4	HERSTELLUNG DER ANTIKÖRPERVERDÜNNUNGEN	29
4.3.4.1	Anti-CD34 und Isotypkontrolle IgG ₁	29
4.3.4.2	Anti-CD133 und Isotypkontrolle IgG _{2b,k}	29
4.3.4.3	Anti-VEGFR-2 und Streptavidin-Per-CP	30
4.3.5	METHODISCHES VORGEHEN BEI DER ZELLEXTRAKTION	31
4.3.6	ABLAUF DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN ANALYSE	33
4.3.7	AUSWERTUNG DER ERMITTELTEN DATEN	35
4.3.8	BERECHNUNG DER ANZAHL DER IM PERIPHEREN BLUT ZIRKULIERENDEN CD34 ⁺ , CD34 ⁺ /CD133 ⁺ UND CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /VEGFR-2 ⁺ ZELLEN	38
4.3.9	ERHEBUNG RELEVANTER KLINISCHER UND LABORCHEMISCHER PARAMETER	41
4.4	STATISTISCHE METHODEN.....	42
4.4.1	STATISTISCHE BETRACHTUNG DER KONTROLL- UND PATIENTENGRUPPEN BEZÜGLICH DER HÄUFIGKEIT DER CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /VEGFR-2 ⁺ STAMMZELLEN	42
4.4.2	STATISTISCHE BETRACHTUNG DER HÄUFIGKEITSBEEINFLUSSUNG DER CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /VEGFR-2 ⁺ STAMMZELLEN DURCH DEN SCHWEREGRAD DER HERZINSUFFIZIENZ	42
4.4.3	STATISTISCHE BETRACHTUNG DER ZIRKULIERENDEN CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /VEGFR-2 ⁺ STAMMZELLEN BEI LEICHTER UND SCHWERER HERZINSUFFIZIENZ	44
4.4.4	STATISTISCHE BETRACHTUNG DES EINFLUSS KLINISCHER UND LABORCHEMISCHER PARAMETER AUF DIE CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /VEGFR-2 ⁺ STAMMZELLEN	44
4.4.5	STATISTISCHE BETRACHTUNG DER CD34 ⁺ UND DER CD34 ⁺ /CD133 ⁺ STAMMZELLEN	45

5	<u>ERGEBNISSE</u>	46
5.1	CHARAKTERISIERUNG DES PATIENTEN- UND KONTROLLKOLLEKTIVES	46
5.2	BETRACHTUNG DER PERIPHER ZIRKULIERENDEN CD34⁺ STAMMZELLEN...	48
5.2.1	HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER ZIRKULIERENDEN CD34 ⁺ STAMMZELLEN IN DER KONTROLL- UND DEN PATIENTENGRUPPEN	48
5.2.2	ABHÄNGIGKEIT DER HÄUFIGKEIT DER ZIRKULIERENDEN CD34 ⁺ STAMMZELLEN VOM AUSPRÄGUNGSGRAD DER HERZINSUFFIZIENZ	51
5.2.3	BETRACHTUNG DER ZIRKULIERENDEN CD34 ⁺ STAMMZELLEN BEI LEICHTER UND SCHWERER HERZINSUFFIZIENZ	52
5.3	BETRACHTUNG DER PERIPHER ZIRKULIERENDEN CD34⁺CD133⁺ STAMMZELLEN	55
5.3.1	HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER ZIRKULIERENDEN CD34 ⁺ CD133 ⁺ STAMMZELLEN IN DER KONTROLL- UND DEN PATIENTENGRUPPEN	55
5.3.2	ABHÄNGIGKEIT DER HÄUFIGKEIT DER ZIRKULIERENDEN CD34 ⁺ CD133 ⁺ STAMMZELLEN VOM AUSPRÄGUNGSGRAD DER HERZINSUFFIZIENZ	57
5.3.3	BETRACHTUNG DER ZIRKULIERENDEN CD34 ⁺ CD133 ⁺ STAMMZELLEN BEI LEICHTER UND SCHWERER HERZINSUFFIZIENZ	59
5.4	BETRACHTUNG DER PERIPHER ZIRKULIERENDEN ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN	62
5.4.1	HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER ZIRKULIERENDEN ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN IN DER KONTROLL- UND DEN PATIENTENGRUPPEN	62
5.4.2	ABHÄNGIGKEIT DER HÄUFIGKEIT DER ZIRKULIERENDEN ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN VOM AUSPRÄGUNGSGRAD DER HERZINSUFFIZIENZ	65
5.4.3	BETRACHTUNG DER ZIRKULIERENDEN ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN BEI LEICHTER UND SCHWERER HERZINSUFFIZIENZ	67
5.4.4	BETRACHTUNG DES EINFLUSSES KLINISCHER UND LABORCHEMISCHER PARAMETER AUF DIE ANZAHL DER ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN	69
5.5	GEGENÜBERSTELLUNG DER EINZELNEN STAMMZELLPOPULATIONEN	70
5.5.1	VERGLEICH DER CD34 ⁺ UND DER CD34 ⁺ CD133 ⁺ STAMMZELLPOPULATIONEN MITEINANDER	70

5.5.2	VERGLEICH DER CD34 ⁺ STAMMZELLPOPULATIONEN MIT DER POPULATION DER ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN	71
5.5.3	VERGLEICH DER CD34 ⁺ CD133 ⁺ STAMMZELLPOPULATIONEN MIT DER POPULATION DER ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN	72
6	<u>DISKUSSION</u>	73
6.1	VARIABILITÄT DER ANZAHL ENDOTHELIALER VORLÄUFERZELLEN BEI HERZINSUFFIZIENZPATIENTEN	73
6.2	VARIABILITÄT DER ANZAHL DER CD34 POSITIVEN STAMMZELLEN BEI HERZINSUFFIZIENZPATIENTEN	79
6.3	VARIABILITÄT DER ANZAHL DER CD34 ⁺ /CD133 ⁺ STAMMZELLEN BEI HERZINSUFFIZIENZPATIENTEN	82
6.4	MÖGLICHE URSACHEN FÜR DIE QUANTITATIVE VERTEILUNG DER ENDOTHELIALEN STAMMZELLEN BEI DER HERZINSUFFIZIENZ	85
6.5	ENDOTHELIALE PROGENITORZELLEN - EINE HETEROGENE ZELLPOPULATION	94
7	<u>SCHLUSSFOLGERUNGEN</u>	97
8	<u>LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS</u>	99
9	<u>ANHANG</u>	109
9.1	LEBENS LAUF.....FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
9.2	VERÖFFENTLICHTE WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN	109
9.3	DANKSAGUNG	110
9.4	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	111

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Herzinsuffizienz ist eine progressive Erkrankung bei der es sich klinisch um ein Syndrom handelt, welches eine gemeinsame Endstrecke verschiedener Erkrankungen, die eine Schädigung des Herzens verursachen, darstellt. Endotheliale Progenitorzellen (EPC – CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen) zirkulieren im Blut, tragen zur Neovaskularisation bei und verbessern die kardiale Funktion nach ischämischen kardiovaskulären Ereignissen, sowohl über direkt vermittelte positive Effekte, als auch über parakrine Wirkungen durch die Freisetzung proangiogener Mediatoren.

Fragestellung: Ziel dieser Arbeit ist es zu eruieren, ob zwischen der Anzahl der peripher im Blut zirkulierenden EPC und dem Schweregrad der Herzinsuffizienz ein Zusammenhang besteht und ob sich die Anzahl dieser Zellen zwischen gesunden Probanden und an Herzinsuffizienz erkrankten Personen quantitativ unterscheidet.

Methodik: Hierzu erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung von 111 Blutproben ausschließlich männlicher Patienten mit Herzinsuffizienz. Die Einteilung des Schweregrades wurde anhand der NYHA-Klassifikation in vier Gruppen vorgenommen. Die Kontrollgruppe umfasste 41 männliche, gesunde Probanden. Vor der Antikörperfärbung der EPC erfolgte zunächst die Lysierung der Erythrozyten. In einem weiteren Arbeitsschritt wurden zur Markierung der EPC Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD34, CD133 und Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) eingesetzt. Anschließend konnte die Anzahl der Zellen durchflusszytometrisch mit dem FACS Calibur™ bestimmt und die Auswertung der CD34⁺-, der CD34⁺/CD133⁺- sowie der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺-Zellpopulation vorgenommen werden.

Ergebnisse: Die Datenauswertung der CD34⁺ Zellen zeigt, dass die Kontrollgruppe über eine statistisch signifikant größere Anzahl an CD34⁺ Zellen verfügt, als die einzelnen NYHA-Klassen. Bei der Betrachtung der jeweiligen NYHA-Stadien ist festzustellen, dass sich die Anzahl der CD34⁺ Zellen tendentiell mit Zunahme der Herzinsuffizienz verringert, ein statistisch signifikantes Ergebnis liegt diesbezüglich jedoch nicht vor.

Bei der Untersuchung der CD34⁺/CD133⁺ Stammzellpopulation kann, verglichen mit den Patientengruppen, ebenfalls ein verstärktes Zellvorkommen bei der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In den einzelnen NYHA-Klassen zeigt sich eine statistisch signifikante Verringerung der CD34⁺/CD133⁺ Zellanzahl in der jeweils höheren Klasse bei

dem Vergleich der NYHA-Gruppen I und IV, II und IV sowie III und IV. Die weiteren Gegenüberstellungen der Erkrankungsstadien weisen keine statistisch signifikanten Unterscheidungen der NYHA-Klassen auf, eine abfallende Tendenz der CD34⁺/CD133⁺ Zellen ist mit Verschlechterung der Herzerkrankung allerdings auch hier erkennbar.

Die Auswertung der EPC-Population erzielt ebenfalls ein statistisch signifikant häufigeres Auftreten der Zellen bei gesunden Probanden, als bei herzinsuffizienten Patienten, mit Ausnahme der NYHA-Klasse I, die ähnliche Zellkonzentrationen wie die Kontrollgruppe besitzt. Eine schrittweise Reduktion der Anzahl der EPC wird mit Zunahme der NYHA-Klasse statistisch signifikant deutlich, ausgenommen der Übergang von Klasse III auf IV.

Das Lebensalter der Patienten kann mit Hilfe der multiplen Regressionsanalyse als negativer Einflussfaktor auf die Anzahl der EPC ermittelt und der Einfluss des Schweregrades der Herzinsuffizienz auf die Konzentration der EPC bestätigt werden.

Schlussfolgerungen: Die Ergebnisse dieser Arbeit veranschaulichen, dass die Quantifizierung der verschiedenen untersuchten Zellpopulationen nicht die gleiche Aussagekraft bezüglich des Schweregrades der Herzinsuffizienz besitzt. Die ermittelten Daten lassen darauf schließen, dass die Population der EPC das Stadium der Herzinsuffizienz am besten widerspiegelt. Dahingegen lässt sich die Schwere der Herzerkrankung anhand der Quantifizierung der CD34⁺ bzw. der CD34⁺/CD133⁺ Stammzellen nur bedingt einschätzen, da es sich bei beiden Zellformen um sehr frühe, primitive Stammzellpopulationen handelt. Die Untersuchung der peripher zirkulierenden EPC könnte zukünftig die Einteilung klinisch schwer klassifizierbarer Patienten erleichtern und in der Verlaufsbeobachtung eine Progression der Erkrankung möglicherweise früh anzeigen, wodurch sich klinisch relevante Konsequenzen ergeben könnten. Um die quantitative Bestimmung der EPC in Zukunft als ergänzende, nicht invasive Methode zur Einschätzung des Herzinsuffizienzschweregrades zu etablieren, ist zum einen die Festlegung eines allgemein gültigen, standardisierten Protokolls zur Identifizierung und zur Quantifizierung der EPC erforderlich, sodass die Reproduzierbarkeit der Methode gewährleistet ist. Zum anderen müssen Grenzwerte der Zellanzahl für die einzelnen NYHA-Klassen festgelegt werden. Zur Klärung dieser Aspekte sind weitere Studien notwendig. Die Ursachen für die stufenweise Reduktion der EPC in den einzelnen Stadien der Herzinsuffizienz sind vielfältig. Es können ein gesteigerter EPC-Bedarf, eine Verminderung der Mobilisierung der EPC aus dem Knochenmark bzw. eine Störung der Zellmigration in das Gewebe oder eine verkürzte Überlebenszeit der peripheren EPC in Frage kommen.

2 Einleitung

2.1 Überblick über das Erkrankungsbild der Herzinsuffizienz

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Als Herzinsuffizienz kann das Spätstadium nahezu jeder Herzerkrankung bezeichnet werden. Das Herz ist nicht mehr fähig, die Organe und die Peripherie des Organismus ausreichend mit Sauerstoff und Substraten zu versorgen, da die Leistungsfähigkeit des Myokards vermindert ist. Klinisch handelt es sich bei dem Erkrankungsbild der Herzinsuffizienz um einen Symptomkomplex und die gemeinsame Endstrecke verschiedener Erkrankungen, die eine myokardiale Destruktion hervorrufen (Erdmann 2006, Kempf et al. 2007, Siegenthaler 2001).

Laut Angaben des Statistischen Bundesamtes (DESTATIS 2008) war die Herzinsuffizienz im Jahr 2006 mit 317.000 Fällen die häufigste Ursache für einen stationären Klinikaufenthalt und mit 47.079 Todesfällen insgesamt die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Die Inzidenz beträgt zwischen dem 50. und 59. Lebensjahr 0,8%, steigt aber ab etwa dem 65. Lebensjahr steil an auf ca. 6 - 10% (McMurray und Pfeffer 2005). In Deutschland wird die Prävalenz auf annähernd 2 Millionen Erkrankte beziffert (Parsi und Parsi 2001). Stadienabhängig weist die Herzinsuffizienz eine Letalität von 20 - 30% pro Jahr auf (Ho et al. 1993, Mazhari und Hare 2007). Die 5-Jahres Überlebensrate herzinsuffizienter Patienten liegt in epidemiologischen Studien etwa bei 30% bis 35%, somit ist die Prognose der Herzinsuffizienz, vor allem im fortgeschrittenem Erkrankungsstadium, nach wie vor ungünstig (Owan et al. 2006).

2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Eine chronische Drucküberlastung des linken Ventrikels, beispielsweise durch eine arterielle Hypertonie, kann als entscheidender ätiologischer Faktor bei der Entstehung der Herzinsuffizienz angesehen werden. Die Höhe des Blutdruckes korreliert mit der Inzidenz

der Herzinsuffizienz (Eriksson et al. 1989). Daneben stellt die koronare Herzkrankheit (KHK) die wichtigste Ursache für die Entwicklung der Herzinsuffizienz dar. Eine Herzinsuffizienz ist zunehmend nach stattgefundenem, überlebten Myokardinfarkt zu beobachten (Hilfiker-Kleiner et al. 2006), da es zum Ersatz der irreversibel geschädigten Kardiomyozyten durch akinetisches Narbengewebe kommt und somit die kardiale Funktion beeinträchtigt wird (Guan und Hasenfuss 2007, Wollert und Drexler 2005). Ein weiterer Risikofaktor für eine myokardiale Schädigung besteht in der Tachykardie. Auch hier nimmt die Inzidenz der Herzinsuffizienz in Abhängigkeit von der Herzfrequenz zu (Kannel und Cupples 1988, Hess 2003, Watanabe et al. 2008). Daneben können Einflussfaktoren, wie ein hohes Lebensalter oder Nikotinabusus, die Manifestation einer Herzinsuffizienz begünstigen (Eriksson et al. 1989). Weiterhin besteht die Gefahr, dass Herzklappenerkrankungen oder angeborene Herzfehler sowie Kardiomyopathien zu einer Insuffizienz des Herzens führen. Seltener können genetische Ursachen für die Ausprägung einer Herzinsuffizienz verantwortlich sein. Dabei ist es möglich, dass angeborene Mutationen eine Kardiomyopathie auslösen oder das Fortschreiten einer erworbenen Herzinsuffizienz beeinflussen (Kempf et al. 2007, Morita et al. 2005, Scheffold et al. 2005).

Durch die initiale Schädigung des Herzens kommt es zur Auslösung einer progredienten Verschlechterung der Pumpfunktion. Dieser Prozess führt, auch nach einem länger andauernden symptomfreien Intervall, zum klinischen Bild der Herzinsuffizienz mit ventrikulärem Remodeling (Mann und Bristow 2005). Dabei werden relativ unabhängig vom Auslöser prinzipielle pathophysiologische Mechanismen aktiviert. Aus diesem Grund führen verschiedene Erkrankungen zu ein und demselben klinischen Erscheinungsbild (Kempf et al. 2007).

2.1.3 Formen der Herzinsuffizienz

Eine akute Herzinsuffizienz kann sich innerhalb sehr kurzer Zeit, aufgrund eines ausgedehnten Myokardinfarktes, durch Herzrhythmusstörungen oder durch eine akut aufgetretene hypertensive Krise, entwickeln. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der chronischen Herzinsuffizienz um eine länger bestehende, oft progressive Erkrankung, bei der eine Vielzahl von Kompensationsmechanismen wirken (Mann und Bristow 2005, Parsi und Parsi 2001).

Die chronische Herzinsuffizienz kann nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden. Das Pumpversagen des Herzens ist dadurch gekennzeichnet, dass das Organ nicht mehr fähig ist, ausreichend Blut in die arterielle Strombahn auszuwerfen (Vorwärtsversagen) oder dem Zufluss an venösem Blut, aufgrund einer inadäquaten Auswurfleistung, gerecht zu werden. Es manifestieren sich Stauungssymptome in der Strombahn vor dem betroffenen Ventrikel (Rückwärtsversagen). Das Vorwärtsversagen ist vor allem durch einen niedrigen Blutdruck und die daraus entstehenden Folgen einer verringerten Organperfusion, wie Leistungsminderung, prärenales Nierenversagen, periphere Zyanose sowie Symptome einer zerebralen Minderversorgung, gekennzeichnet. Beim Rückwärtsversagen ist die Konsequenz eine Filtration von Flüssigkeit in das Interstitium und die Ausprägung von Stauungssymptomen wie z.B. ein Lungenödem bei der Linksherzinsuffizienz. Ist das rechte Herz betroffen, können sich eine Stauungsleber, periphere Ödeme, Aszites oder Pleuraergüsse manifestieren (Erdmann 2006).

Weiterhin lässt sich unterscheiden zwischen einer Pumpfunktionsstörung und einer Füllungsstörung des Herzens. Es wird davon ausgegangen, dass bis zu 30 - 40% der Herzinsuffizienzpatienten primär an einer diastolischen Herzinsuffizienz erkranken (Hess 2003, Hoppe 2007). Dabei handelt es sich um eine ungenügende ventrikuläre Füllung aufgrund einer Relaxations- oder Compliance-Störung (Bonow und Udelson 1992, Scheffold et al. 2005). Diese Veränderung der myokardialen Steifigkeit wird häufig als eigenständiges Erkrankungsbild angesehen. Bei der systolischen Herzinsuffizienz ist das Vorwärtsversagen vermehrt zu beobachten. Bei der diastolischen Herzinsuffizienz manifestiert sich das Rückwärtsversagen oftmals durch eine Beeinträchtigung der ventrikulären Füllung während der Diastole. Allerdings kommt es häufig zu einer Kombination von systolischer und diastolischer Funktionsstörung und folglich auch zur Kombination der Symptome (Erdmann 2006).

Als häufigste Form der Herzinsuffizienz ist vermutlich die verminderte Auswurfleistung (Low-output-Herzinsuffizienz) zu nennen, wodurch die Deckung des peripheren Bedarfs nicht mehr gewährleistet werden kann (Mehta und Dubrey 2008). Die High-output-Herzinsuffizienz ist die seltenere Form und beschreibt den gesteigerten peripheren Verbrauch durch Veränderung der Stoffwechselaktivität und eine gesteigerte periphere Zirkulation wie z.B. eine Thyreotoxische Krise (Froeschl et al. 2005), Sepsis (Rotherham 1989) oder Anämie (Fowler und Holmes 1975). Das Herz ist dann nicht mehr in der Lage,

über eine Erhöhung der Auswurfleistung den Blutdruck konstant zu halten (Mehta und Dubrey 2008). Die Low-output-Form wird in ihrem Verlauf und ihrer Symptomatik durch neurohumorale Gegenregulationsmechanismen beeinflusst (Erdmann 2006).

2.1.4 Schweregradeinteilung der Herzinsuffizienz

Die Symptomatik und der klinische Verlauf der Herzinsuffizienz werden bestimmt von Art und Ausmaß der Grunderkrankung sowie vom klinischen Schweregrad. Die Verbesserung der Prognose der Herzinsuffizienz ist als Therapieziel entscheidend vom funktionellen Schweregrad der Erkrankung abhängig. Von der New York Heart Association wurde 1942 erstmals eine Klassifikation veröffentlicht, die es ermöglicht, herzerkrankte Patienten anhand ihres klinischen Schweregrades in Stadien einzuteilen und somit prognostische Aussagen treffen zu können. Die Einschätzung der funktionellen Leistungsfähigkeit wird durch den behandelnden Arzt beurteilt und in die Stadien I bis IV eingeteilt, wie in Tabelle 1 dargestellt (Erdmann 2006).

Tabelle 1: Klassifikation der Herzinsuffizienz basierend auf der Einteilung der New York Heart Association (NYHA).

NYHA - Stadium	Erkrankungsmerkmale
I	<ul style="list-style-type: none"> • Herzerkrankung ohne körperliche Beeinträchtigungen • Alltägliche körperliche Beanspruchung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Dyspnoe oder Angina pectoris
II	<ul style="list-style-type: none"> • Herzerkrankung mit leichter Beeinträchtigungen der körperlichen Leistungsfähigkeit • Keine Beschwerden in Ruhe, alltägliche körperliche Beanspruchung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Dyspnoe oder Angina pectoris
III	<ul style="list-style-type: none"> • Herzerkrankung mit höhergradiger Beeinträchtigungen der körperlichen Leistungsfähigkeit • Keine Beschwerden in Ruhe, geringe körperliche Beanspruchung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Dyspnoe oder Angina pectoris
IV	<ul style="list-style-type: none"> • Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten sowie in Ruhe

2.2 Die Oberflächenantigene der endothelialen Progenitorzellen

2.2.1 Das Oberflächenantigen CD34

Das Antigen CD34 ist ein Oberflächen-Glycophosphoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kD (Fina et al. 1990), welches auf frühen lympho-hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird. Diese Zellen machen einen Anteil von etwa 1,5% aller mononucleären Zellen des Knochenmarks aus (Krause et al. 1996). Da es sich bei CD34 um ein stadienspezifisches Antigen handelt, findet der anti-human CD34-Antikörper bei der Selektion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen des Menschen Verwendung. Im fetalen Knochenmark nimmt die Expression von CD34 nach Festlegung der hämatopoietischen Progenitorzellen auf eine spezifische Abstammungslinie ab. Zellen, die CD34 in hohem Maße exprimieren, gelten als primitivste Form der Stammzellen (DiGiusto et al. 1994). Ein Teil der CD34 positiven hämatopoietischen Zellen besitzt die Fähigkeit in vitro in Endothelzellen zu differenzieren und endotheliale Marker, wie beispielsweise von Willebrand Faktor (vWF) zu exprimieren und endotheliale Eigenschaften auszuprägen, wie z.B. die Aufnahme von acetyliertem Low-density Lipoprotein (ac-LDL) (Shi et al. 1998). CD34 wird, neben den lympho-hämatopoietischen Stammzellen, auch von kapillären Endothelzellen des Erwachsenen (Fina et al. 1990) und embryonalen Fibroblasten (Brown et al. 1991, Krause et al. 1996) exprimiert. Es wird vermutet, dass die Funktion des CD34 Moleküls in der Interaktion zwischen den einzelnen Endothelzellen und möglicherweise auch in der Zelladhäsion besteht. Es zeigte sich in vivo eine strenge Anordnung der CD34 Moleküle primär an der luminalen Seite der Endothelzellen, insbesondere in der Nähe zu interzellulären Prozessen der endothelialen Zellmembran. Dies könnte auf eine Bedeutung von CD34 bei der Zell-Zell-Interaktion hinweisen (Fina et al. 1990). Es ist jedoch bekannt, dass die Dichte des CD34 Antigens bei frühen Vorläuferzellen am höchsten ist und sich mit der Reifung der Zellen zunehmend verringert, sodass komplett differenzierte, ausgereifte Zellen für CD34 negativ sind (Civin et al. 1987).

2.2.2 Das Oberflächenantigen CD133

Bei dem Oberflächenantigen CD133 (Synonym AC133 oder Prominin [beschreibt die murine Form]) handelt es sich um ein 5-Transmembran Antigen. Es liegt als glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kD vor. Die Struktur des Oberflächenantigens setzt sich zusammen aus den 5-Transmembran-Domänen mit einem extrazellulären N-Terminus, zwei großen extrazellulären Schleifen, zwei kleinen zytoplasmatischen Schleifen und einem zytoplasmatischen C-Terminus (Miraglia et al. 1997).

Die zelluläre Expression von CD133 ist mehrheitlich innerhalb der CD34 positiven Populationen von Progenitorzellen zu finden, die aus dem Knochenmark, dem adulten peripheren sowie dem Nabelschnurblut und der fetalen Leber stammen (Yin et al. 1997). Das Oberflächenantigen CD133 wurde nicht nur auf hämatopoietischen Vorläuferzellen detektiert, sondern auch auf zirkulierenden Zellen mit endothelialen Eigenschaften (Peichev et al. 2000). Allerdings wird CD133 nicht auf ausgereiften Endothelzellen exprimiert (Handgretinger et al. 2003, Miraglia et al. 1997). Die Entdeckung des Antigens CD133, welches primitive Stammzellen identifiziert, ermöglicht erst die Abgrenzung reifer zirkulierender Endothelzellen von unreifen zirkulierenden EPC, welche durch die alleinige Verwendung von Antikörpern gegen CD34 nicht mit hoher Sicherheit erreichbar ist (Peichev et al. 2000, Salven et al. 2003). Die Expression von CD133 ist auf Stamm- bzw. Progenitorzellen, auf bestimmte Zellenlinien des Teratokarzinoms und Retinoblastoms, auf eine CD34 positive Blastenpopulation bei akuter Leukämie und möglicherweise auf wenige weitere Gewebe, wie die Retina, Plazenta oder die Inselzellen des Pankreas, beschränkt (Horn et al. 1999, Miraglia et al. 1997, Yin et al. 1997). Während der Zelldifferenzierung geht die Expression von CD133 rasch verloren, was dafür spricht, dass es sich bei CD133 um ein sehr frühes Antigen handelt (Yin et al. 1997). Gegenwärtig ist noch ungeklärt, ob CD133 nur als Oberflächenantigen fungiert oder funktionelle Aktivitäten innerhalb der Regulation der Neovaskularisation besitzt (Urbich und Dimmeler 2004).

2.2.3 VEGF und das Oberflächenantigen VEGFR-2

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) ist ein 40 kD schweres Glykoprotein, welches ursprünglich aufgrund seiner permeabilitätssteigernden Einflüsse auf Gefäße, sezerniert von Tumorzellen, als vascular permeability factor (VPF) beschrieben wurde (Keck et al. 1989, Senger et al. 1983). Daneben kommt VEGF und seinen Rezeptoren durch Stimulation des Wachstums und der Differenzierung von Endothelzellen im Rahmen der embryonalen Entwicklung, aber auch aufgrund seiner physiologischen und pathologischen Beeinflussung adulter Gefäße, eine besondere Bedeutung zu. Auf kultivierte Endothelzellen übt VEGF eine direkte Wirkung aus, indem es die zytoplasmatische Kalziumkonzentration erhöht (Brock et al. 1991, Senger et al. 1993), zu einer Veränderung der Zellmorphologie führt (Senger et al. 1993) und sowohl das Zellwachstum (Connolly et al. 1989) als auch die Zellmigration (Favard et al. 1991) induziert. VEGF besitzt die Fähigkeit als multifunktionelles Zytokin direkt mit der Endothelzelle zu agieren. Über die Binding an spezifische Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C und es wird eine kurzfristige Steigerung der Kalziumionen-Konzentration induziert (Senger et al. 1993). In Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass VEGF eine essentielle Funktion bei der Gefäßneubildung besitzt, denn bereits der Verlust eines einzigen VEGF-Allels führte in Versuchen zum Tod von Mäuseembryonen (Ferrara et al. 1996, Carmeliet et al. 1996). Weiterhin fungiert VEGF als erhaltender Faktor für neu ausgebildete Gefäße und Endothelzellen (Alon et al. 1995, Benjamin und Keshet 1997). VEGF wird durch eine Anzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, zu denen unter anderem IL-6 zählt sowie durch Hypoxie und Hypoglykämie reguliert (Brogi et al. 1996, Cohen et al. 1996, Stein et al. 1995). Es ist erwiesen, dass der Freisetzung von VEGF, beispielsweise als Reaktion auf vaskuläre Destruktionen, eine rasche Mobilisation endothelialer Vorläuferzellen in den Blutkreislauf folgt (Asahara et al. 1999, Gill et al. 2001). Der VEGF Signalweg wird über die Tyrosinkinasen VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor-1) und VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2) vermittelt. Das Oberflächenantigen VEGFR-2 wird spezifisch von den EPC exprimiert und ist auch unter den Bezeichnungen KDR (kinase insert domain) oder Flk-1 (fetal liver kinase-1) bekannt (Gehling et al. 2000). Es zeigte sich, dass der Flk-1/KDR-Rezeptor ganz wesentlich zur Hämatopoiese und zur Vaskulogenese beiträgt (Shalaby et al. 1997).

2.2.4 Charakteristika der endothelialen Progenitorzellen

In den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts konnte erstmals die Anwesenheit zirkulierender Endothelzellen nachgewiesen werden. In einer Dacron®-Gefäßprothese, welche jungen Schweinen implantiert worden war, wurde die Entstehung von Endothel-Inseln im Zentrum der Prothese beobachtet. Dies ließ darauf schließen, dass sich im Blut zirkulierende Zellen befinden die in der Lage sind, eine Endothelzellschicht auszubilden (Stump et al. 1963). Einige Jahre später wurde eine Arbeit veröffentlicht die darüber berichtete, dass aus den Koronargefäßen eines transplantierten menschlichen Herzens Endothelzellen des Organempfängers isoliert werden konnten (Kennedy und Weissman 1971). Vor etwa 15 Jahren wurde des Weiteren beschrieben, dass implantierte ventrikuläre Unterstützungssysteme (left ventricular assist device, LVAD) ebenfalls von einer Endothelzellschicht ummantelt werden, was darauf hinweist, dass im Blut zirkulierende Endothelzellen oder endotheliale Vorläuferzellen vorliegen, die zur Ausbildung einer Endothelschicht fähig sind (Frazier et al. 1993). Im Jahr 1997 wurde erstmals die Existenz von endothelialen Progenitorzellen nachgewiesen und wissenschaftlich belegt, dass peripher zirkulierende CD34⁺ Zellen in der Lage sind, Endothelzellkolonien auszubilden (Asahara et al. 1997).

Aus dem Knochenmark stammende endotheliale Vorläuferzellen (EPC) und hämatopoietische Stammzellen exprimieren eine Vielzahl gleicher Oberflächenantigene. Deshalb wird angenommen, dass diese beiden Stammzelltypen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle -dem Hämangioblasten- abstammen (Shi et al. 1998, Peichev et al. 2000). Die endothelialen Stammzellen besitzen mengenmäßig einen Anteil von weniger als 1% der Zellen des Knochenmarks (Yin et al. 1997). Die Anzahl der EPC im peripheren Blut liegt zwischen 0,01% und 0,0001%. Diese geringe Zellmenge zieht ein Defizit an klar definierten Methoden zur Zellisolation und zur Zelldefinition nach sich (Ingram et al. 2005). Zellen, die die Marker CD34, CD133 und VEGFR-2 auf ihrer Oberfläche exprimieren, werden allgemein als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet (Peichev et al. 2000). Darüber hinaus exprimieren die EPC CD31 (entspricht PECAM, platelet endothelial cell adhesion molecule), Tie -2 (Angiopoietin 1 Rezeptor), nehmen ac-LDL (acetyliertes Low-density Lipoprotein) und das pflanzliche Lectin Ulex europaeus auf (Ingram et al. 2005). Neuere Erkenntnisse belegen jedoch, dass die endothelialen Vorläuferzellen neben dem Hämangioblasten auch von nicht-hämatopoietischen mesenchymalen Vorläuferzellen,

zu denen mononucleäre Zellen genauso wie unterschiedliche gewebeständige Stammzellen zählen, abstammen können (Zampetaki et al. 2008). Auch in der Wand großer und mittlerer Gefäße, in der Schicht zwischen Media und Adventitia, der so genannten „vaskulogenen Zone“, sind EPC enthalten (Zengin et al. 2006). Allerdings ist die exakte Charakterisierung dieser Zellen nach wie vor schwierig (Zampetaki et al. 2008). Dies wird an der Arbeit von Hur et al, in der zwei Typen von EPC mit unterschiedlichen Funktionen im Rahmen der Neovaskulogenese beschrieben werden, deutlich. Die frühen EPC besitzen eine geringere Überlebenszeit, als die späten EPC und tragen hauptsächlich zur Neovaskularisation bei, indem sie angiogene Zytokine sezernieren und somit reife Endothelzellen stimulieren. Die späten EPC stellen für die Neovaskulogenese, aufgrund ihres hohen proliferativen Potentials, die entsprechende Anzahl von Endothelzellen bereit (Hur et al. 2004). Reife Endothelzellen dagegen verlieren die Oberflächenproteine CD34 und CD133 und beginnen stattdessen endothelspezifische Proteine wie CD31, VE-Cadherin (vascular endothelial cadherin) und vWF (von Willebrand Faktor) zu exprimieren. Vermutlich findet im Rahmen des Verlustes von CD133 und folgend von CD34 die Differenzierung der zirkulierenden EPC in die reifen Endothelzellen statt (Hristov et al. 2003).

In Arealen, in denen eine angiogene Aktivierung stattfindet, sind die EPC an der Ausbildung und der Formierung neuer Blutgefäße beteiligt (Murohara et al. 2000). Dieser Vorgang wird als postnatale Vaskulogenese bezeichnet und beschreibt die in situ Differenzierung von vaskulären Endothelzellen aus endothelialen Vorläuferzellen (Asahara et al. 1997, Ergun et al. 2007). Die Angiogenese hingegen charakterisiert das Wachstum von Gefäßen, ausgehend von differenzierten Endothelzellen bereits bestehender Gefäße (Asahara et al. 1997). Die postnatale Neovaskulasation besitzt sowohl vaskulogene, als auch angiogene Komponenten (Kalka et al. 2000).

Es wird angenommen, dass die EPC bei Patienten mit Koronarerkrankungen eine Schlüsselrolle zur Erhaltung der vaskulären Homöostase spielen (Ben-Shoshan und George 2007). Diese EPC sind in der Lage vaskuläre Reparaturmechanismen zu bewirken und die Progression arteriosklerotischer Plaques, hervorgerufen durch eine ständige Gefäßschädigung, abzuschwächen (Zampetaki et al. 2008). Eine reduzierte Anzahl peripher zirkulierender EPC kann als unabhängiger Vorhersagewert für die Progression arteriosklerotischer Plaques bei Patienten mit KHK fungieren (Schmidt-Lucke et al. 2005).

Kardiovaskuläre Hochrisikopatienten weisen im Vergleich zu Niedrigrisikopatienten eine geringere Konzentration an EPC auf (Hill et al. 2003). Es besteht ebenso ein gesicherter Zusammenhang zwischen der steigenden Anzahl der EPC und dem abnehmenden Risiko für gravierende kardiovaskuläre Ereignisse oder Krankenhausaufenthalte bei Patienten mit KHK. Die Menge und Funktion der EPC korrelieren umgekehrt mit dem Vorliegen und der Ausprägung kardiovaskulärer Risikofaktoren (Vasa et al. 2001b, Werner et al. 2005). Die EPC-Konzentration kann deshalb als Biomarker zur Vorhersage bzw. Abschätzung kardiovaskulärer Risikofaktoren und der vaskulären Funktion dienen (Schmidt-Lucke et al. 2005, Zampetaki et al. 2008).

Im Tiermodell an Ratten mit einem induzierten Myokardinfarkt wurde nachweisen, dass die Infusion menschlicher endothelialer Vorläuferzellen zur selektiven Migration dieser Zellen in das ischämische Myokard und somit zur Neoangiogenese führte. Weiterhin waren eine reduzierte Apoptose der Kardiomyozyten sowie eine verringerte Ausprägung von Narbengewebe bei den behandelten Tieren und somit eine verbesserte kardiale Funktion zu beobachten (Kocher et al. 2001). Auch bei Patienten mit akutem Herzinfarkt konnte eine verbesserte kardiale Funktion nach intrakoronarer Infusion von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark beobachtet werden (Assmus et al. 2002, Strauer et al. 2002, Schachinger et al. 2006, Bartunek et al. 2005). Werden humane EPC, isoliert aus dem peripheren Blut von Erwachsenen, mit neonatalen Kardiomyozyten von Ratten kultiviert, so sind diese Zellen in der Lage in kardiale Myozyten zu transdifferenzieren (Badorff et al. 2003). Zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz, bei der die Injektion der EPC katheter-gestützt transendokardial in das Myokard erfolgte, wurden bereits erste Studien durchgeführt. Dabei waren eine verbesserte linksventrikuläre Funktion, ein reduzierter Sauerstoffverbrauch des Herzens und eine gesteigerte Belastbarkeit der Patienten zu beobachten (Perin et al. 2003, Silva et al. 2004). Die endothelialen Stammzellen besitzen darüber hinaus parakrine Eigenschaften, indem sie über die Freisetzung proangiogener Faktoren das Gefäßwachstum sowie eine gesteigerte Migration reifer Endothelzellen und ruhender, gewebsständiger kardialer Vorläuferzellen fördern und so zur Regeneration geschädigten Gewebes beitragen (Rehman et al. 2003, Urbich et al. 2005a). Die EPC können als ein endogenes Reparatursystem angesehen werden, welches eine Endotheldysfunktion durch ständig einwirkende Risikofaktoren verhindert und ein funktionsfähiges Endothel wiederherstellt (Andreou et al. 2006).

3 Fragestellung

Trotz des nachgewiesenen Nutzens und der Verbesserung von pharmakologischen und nicht-pharmakologischen Behandlungsstrategien des Syndroms der Herzinsuffizienz, kommt es gegenwärtig nach wie vor zur Progression des Erkrankungsbildes. Damit einhergehen die Verschlechterung der Symptomatik, häufige stationäre Krankenhausaufenthalte und vorzeitiges Versterben der an Herzinsuffizienz erkrankten Patienten. Gleichzeitig bestehen noch immer große Lücken in Bezug auf das Verständnis der komplexen zellulären und molekularen Vorgänge, die am Syndrom der Herzinsuffizienz beteiligt sind (Andreou et al. 2006, McMurray und Pfeffer 2005).

Bisher konnten Studien belegen, dass herzinsuffiziente Patienten endotheliale Dysfunktionen aufweisen (Katz 1997, Smith et al. 1996). Es wird zwischen der Endothelfunktion und der Anzahl der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen ein Zusammenhang vermutet. Man nimmt an, dass es -neben einer Vielzahl von Einflussfaktoren- auch aufgrund einer Schädigung des Endothels zur Steigerung der Häufigkeit der endothelialen Progenitorzellen kommt (Hill et al. 2003). In einer Studie von Valgimigli et al wurde 2004 der Einfluss des Schweregrades der Herzinsuffizienz auf die Anzahl der peripher zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen untersucht. Diese Studie schloss in ihrem Patientenkollektiv 41 männliche und weibliche Probanden ein. Es zeigte sich in vorhergehenden Studien, dass das weibliche Sexualhormon Östrogen über antiapoptotische Effekte zu einer Steigerung der Anzahl der peripher zirkulierenden EPC führt (Iwakura et al. 2003, Strehlow et al. 2003). Aus diesem Grund erfolgte in der vorliegenden Arbeit zum einen die Rekrutierung einer Stichprobe mit weitaus größerem Umfang im Vergleich zu Valgimigli et al. Zum anderen wurden ausnahmslos männliche Patienten und Probanden in die Studie eingeschlossen, um den möglicherweise beeinträchtigenden Effekt des Östrogens auszuschließen und den Einfluss der Schwere der Herzinsuffizienz auf die Anzahl der peripher im Blut zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen erneut zu ermitteln und zu bewerten.

Ziel dieser Arbeit ist es, folgende Fragestellungen zu untersuchen:

1. Ist die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen ($CD34^+CD133^+VEGFR-2^+$ Stammzellen) im peripheren Blut abhängig vom Schweregrad der Herzinsuffizienz?
2. Werden die Stammzellpopulationen der CD34 positiven sowie der CD34/CD133 positiven Zellen im peripheren Blut durch den Schweregrad der Herzinsuffizienz in ähnlicher Weise wie die endothelialen Vorläuferzellen beeinflusst?
3. Unterscheidet sich die Häufigkeit der endothelialen Stammzellen zwischen herzinsuffizienten Patienten und gesunden Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren?

4 Patienten und Methoden

4.1 Patienten- und Kontrollgruppe

4.1.1 Patientenkollektiv

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine prospektive Studie. Im Rahmen dieser Studie wurden von 111 männlichen Erwachsenen Blutproben gewonnen und diese anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Bei den Teilnehmern der Studie handelte es sich um Patienten, die sich aufgrund einer Herzinsuffizienz am Universitätsklinikum Jena in der Klinik für Innere Medizin I zur ambulanten oder stationären Behandlung vorstellten. Nach entsprechender Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Probanden zur Teilnahme an der Studie wurde den Patienten unter sterilem Vorgehen 9 ml venöses Vollblut entnommen. Alle erhobenen Patientendaten wurden anonymisiert. Die Studienteilnahme war freiwillig. Die Zustimmung der zuständigen Ethikkommission zur Durchführung der Untersuchungen lag vor (Nr.: 1681-12/05).

Es wurden ausnahmslos männliche Patienten in die Studie aufgenommen, da ein Einfluss der weiblichen Sexualhormone auf die Anzahl der EPCs nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. Somit war die Vergleichbarkeit der Probanden untereinander gewährleistet. Patienten mit einem septischen Krankheitsbild, einem bekannten Tumorleiden, oder einem kurz vorausgegangenen Trauma, wie beispielsweise einer Operation, wurden nicht in die Studie einbezogen, da auch hier ein Effekt auf die Anzahl der untersuchten Zellen angenommen werden musste.

Die Einteilung des Schweregrades der Herzinsuffizienz erfolgte anhand der aktuellen Richtlinien der NYHA-Klassifikation in die Gruppen NYHA I bis NYHA IV. Das Patientenkollektiv setzte sich aus Probanden der NYHA-Klasse I mit $n_1 = 32$, der NYHA-Klasse II mit $n_2 = 34$, der NYHA-Klasse III mit $n_3 = 35$ sowie der NYHA-Klasse IV mit $n_4 = 10$ zusammen. Der Altersdurchschnitt der Patienten betrug $60 \pm 12,5$ Jahre, der Altersmedian lag bei 63 Jahren.

Ätiologisch standen bei den herzinsuffizienten Patienten vor allem die Dilatative Kardiomyopathie (38%), die ischämische Destruktion des Myokards (30%) sowie eine hypertensive Schädigungen des Herzens (22%) im Vordergrund. Seltener Ursachen stellten entzündliche (6 %) und valvuläre Erkrankungen (4%) dar.

4.1.2 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv setzte sich aus 41 männlichen Probanden zusammen, die sich am Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums zur Blutspende bereiterklärten. Alle erhobenen Probandendaten wurden anonymisiert und es lag die Zustimmung der verantwortlichen Ethikkommission zu den durchgeführten Analysen vor (Nr.: 1618-12/05). Die Probanden wurden routinemäßig gesundheitlich untersucht, bevor eine Zulassung zur Blutspende erfolgte, sodass ausschließlich körperlich und organisch gesunde Teilnehmer in das Kontrollkollektiv aufgenommen wurden. Auch hier wurden weibliche Blutspender von der Studie ausgeschlossen, da ein möglicher Einfluss der weiblichen Sexualhormone auf die Zahl der untersuchten Zellpopulationen bestehen konnte. Das Durchschnittsalter der Probanden betrug $32 \pm 7,6$ Jahre, der Altersmedian liegt bei 30 Jahren.

4.2 Materialien und Geräte

4.2.1 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 sind alle für die durchflusszytometrische Untersuchung der EPC verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Monovetten (EDTA KE/9ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen <ul style="list-style-type: none"> - Plastibrand® 1000 µl - Plastibrand® 200 µl - Micro 10 µl, clear 	BRAND GmbH + CO KG Wertheim, Deutschland BRAND GmbH + CO KG Wertheim, Deutschland Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Österreich
Micro Test Tube 1,5 ml (Reaktionsgefäß)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Greiner bio-one CELLSTAR® PP-Test Tubes, 50 ml, sterile	Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Österreich
BD Falcon™ 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube (Analyse- röhrchen)	BD Biosciences, Bedford, MA, USA

4.2.2 Verwendete Geräte

In Tabelle 3 sind alle für die durchflusszytometrische Untersuchung der EPC verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Pipetten <ul style="list-style-type: none"> - Eppendorf 200-1000 µl - Eppendorf Research 2-20 µl - 200 µl Pipetman - 10 µl Pipetman - 2 µl Pipetman - Biozym PerCision® 5-50 µl 	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Gilson Inc., Middleton, USA Gilson Inc., Middleton, USA Gilson Inc., Middleton, USA Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäßständer Micro Test Tube Rack	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Analyseröhrchenständer	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
Kühlschränke <ul style="list-style-type: none"> - Liebherr Typ 2000 61 - Medical Refrigeration 	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riss, Deutschland AB Electrolux, Stockholm, Schweden
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Blutanalysegerät: Cell-Dyn 4000®	Abbott GmbH Diagnostika, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland
Durchflusszytometer: FACS Calibur™ Geräte IC-Nr. 000 002 5928	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Computer Power MAC G4 Betriebssystem Apple 7.1 CellQuest™-Pro Version 5.2	Apple Comp. Inc., California, USA Apple Mac OS, California, USA BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Statistik: SPSS 15.0 für Windows® Microsoft Office Excel 2003©	SPSS Inc. Microsoft Corporation

4.2.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 4 sind alle für die durchflusszytometrische Untersuchung der EPC verwendeten Chemikalien und Reagenzien aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Ampuwa® Spüllösung (Aqua ad iniectabilia / deionisiertes Wasser)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
BD FACST TM Lysing Solution	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Phosphate Buffered Saline-Tabletten	SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BD FACST TM Flow (Trägerlösung)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
BD FACST TM Safe (Desinfektionslösung)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
BD FACST TM Rinse (Reinigungslösung)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

4.2.4 Verwendete Antikörper und Sekundärreagenzien

Antikörper CD34 (BD Biosciences Pharmingen™, San Jose, CA, USA)

Fluoreszenz:	FITC
Spezifität/Rezeptor:	anti-human Antikörper/CD34, Epitop Klasse III
Ursprung:	monoklonaler Antikörper der Maus
Klon:	581
Isotyp:	Maus IgG ₁ , κ
Lagerung:	Lichtgeschützt bei 4°C

Antikörper CD133 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

Fluoreszenz:	PE
Spezifität/Rezeptor:	anti-human Antikörper/CD133, Epitop 2
Ursprung:	monoklonaler Antikörper der Maus
Klon:	293C3
Isotyp:	Maus IgG2b
Lagerung:	Lichtgeschützt bei 4°C

Antikörper VEGF Rezeptor-2 (Sigma®, Saint Louis, USA)

Fluoreszenz:	Biotin konjugiert, in Kombination mit Streptavidin PerCP
Spezifität/Rezeptor:	anti-human Antikörper/VEGF Rezeptor-2
Ursprung:	monoklonaler Antikörper der Maus
Klon:	KDR-2 oder 260.4
Isotyp:	Maus IgG ₁
Lagerung:	Tiefgekühlt und lichtgeschützt

Sekundärreagenz Streptavidin PerCP (BD Biosciences, San Jose, USA)

Fluoreszenz:	PerCP
Spezifität/Rezeptor:	Zur Fluoreszenzmarkierung Bindung an das biotinylierte Ende des Anti-VEGFR-2
Ursprung:	chromatographisch hergestellt aus Streptomyces avidinii
Lagerung:	Lichtgeschützt bei 4°C

Isotypkontrolle IgG₁ (BD Biosciences, San Jose, USA)

Fluoreszenz: FITC
Spezifität/Rezeptor: anti-murin/IgG₁
Ursprung: monoklonaler Antikörper der Maus
Klon: X40
Isotyp: Maus IgG₁
Lagerung: Lichtgeschützt bei 4°C

Isotypenkontrolle IgG_{2b,κ} (BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA)

Fluoreszenz: PE
Spezifität/Rezeptor: anti-murin/ IgG_{2b,κ}
Ursprung: monoklonaler Antikörper der Maus
Klon: MPC-11
Isotyp: Maus IgG_{2b,κ}
Lagerung: Lichtgeschützt bei 4°C

4.2.5 Erläuterung der Durchflusszytometrie anhand des FACS Calibur™

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem FACS Calibur™ der Firma BD Biosciences, Heidelberg durchgeführt. Zur Steuerung der Analyse sowie der Auswertung der ermittelten Datensätze diente das Computerprogramm CellQuest™-Pro von BD Biosciences.

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, um quantitative, molekulare und funktionelle Charakterisierungen von Zellen vorzunehmen. Typische Verfahren sind die Bestimmung des DNA-Gehalts, beispielsweise von Tumorzellen. Die Quantifizierung von Zellen, welche über Antikörper identifiziert werden -wie in der vorliegenden Arbeit- sowie die immunologische Bestimmung der Expressionsdichte von Rezeptoren oder die Untersuchung von Koexpressionsmustern verschiedener Antigene stellen weitere Anwendungsgebiete der Durchflusszytometrie dar.

Das Prinzip der durchflusszytometrischen Analyse beruht auf dem hydrodynamischen Transport von Zellen, die in einem Probenstrom geschlossen in einer einzelnen Küvette analysiert werden (siehe Abbildung 1). Durch diesen Vorgang wird eine Zellsuspension von einer Hüllflüssigkeit (sheath fluid, BD FACS™ Flow) umgeben und verdünnt, wodurch die Zellen einzeln aneinander gereiht und fokussiert einen Laserstrahl (FACS Calibur™ mit einem bei 488nm emittierenden Argon-Laser) im rechten Winkel passieren. Die dabei entstehende Lichtstreuung kann zeitgleich mit den Fluoreszenzsignalen (FL-1, -2, etc.) detektiert werden.

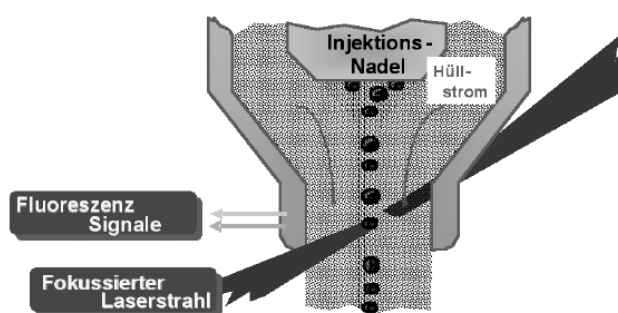


Abbildung 1: Prinzip des hydrodynamischen Transports in der Messküvette. Die Zellsuspension wird von einem Hüllstrom umgeben und die Zellen somit vereinzelt und fokussiert am optischen Messpunkt (fokussierter Laser als monochromatische Lichtquelle) vorbeigeführt [modifiziert nach (Rothe 2007)].

Tritt der Probenstrom durch den Fokus des Lasers, so werden als physikalische Messgrößen zum einen die Lichtstreuung der Zelle in einem schmalen Winkel zum Laserlicht als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) erfasst, zum anderen die Lichtstreuung der Zelle im 90° Winkel als Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC; siehe Abbildung 2).

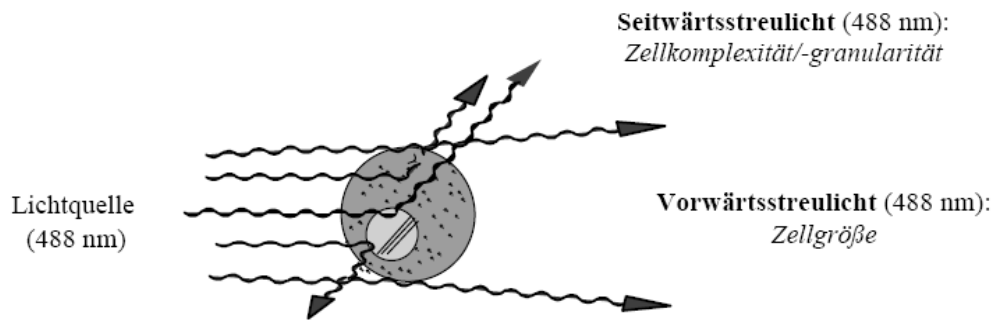
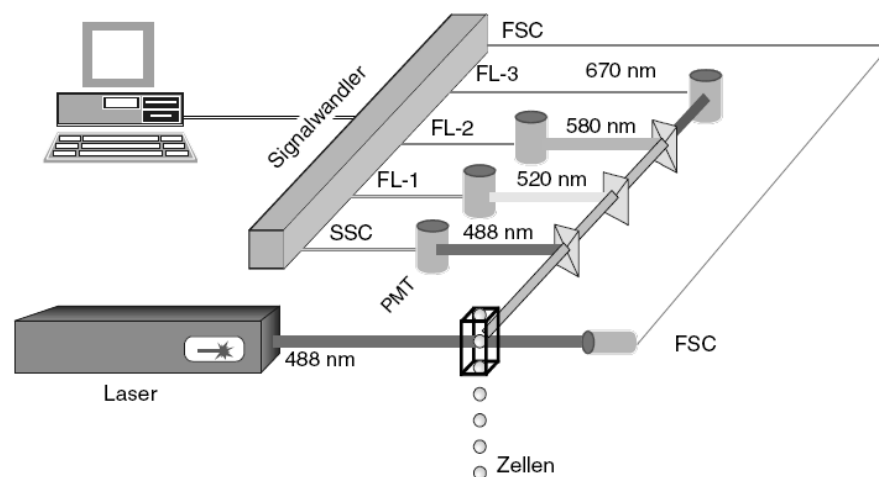


Abbildung 2: Darstellung der Lichtstreuung der Einzel-Zelle im fokussierten Laserstrahl [modifiziert nach (BD 2008)].

Das FSC stellt vorrangig ein Maß für die Zellgröße dar, während das SSC von der Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Kompartimente der Zelle abhängt und als Marker für die Zellgranularität betrachtet wird. Um eine genauere Unterteilung der Zellen bzw. verschiedener Zellpopulationen zu erzielen, werden Antikörper gegen bestimmte zelluläre Antigene eingesetzt. Diese sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und können auf diese Weise mit dem FACS erfasst werden. Monoklonale oder polyklonale Antikörper für den immunologischen Nachweis von Antigenen können direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt vorliegen, wie zum Beispiel bei der FITC-Markierung. Eine indirekte Methode stellt die Biotinylierung von Antikörpern dar. Bei dieser werden die Antikörper in einem zweiten Schritt, nach der eigentlichen Antigen-Antikörper-Bindung, mit dem fluoreszenzmarkiertem Streptavidin abgesättigt und somit wird ein für das FACS detektierbares Fluoreszenzsignal generiert.

Die Fluoreszenzsignale werden in alle Richtungen gleichmäßig abgegeben, da die Lichtstreuung mit zunehmendem Winkel zum Laserstrahl abnimmt, wird die Fluoreszenz in einem Winkel von 90° detektiert. Durch die Energie des Laserlichtes wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt und kann in Folge dessen längerwelliges Fluoreszenzlicht



- 24 -

Um während der Messung die relevanten Zellen -in der vorliegenden Arbeit die Lymphozyten und Stammzellen- von einem kontinuierlichen Hintergrundrauschen zu trennen, muss ein Triggerparameter (Schwellenwert, threshold) festgelegt werden. Wird der Schwellenwert überschritten, erfolgt die Speicherung des entsprechenden Zellsignals.

Bei den hier durchgeführten Analysen wurde der Schwellenwert wie folgt definiert:

Primary Parameter: FSC; Value: 178; Secondary Parameter: None.

Dies bedeutet, alle Zellen ab einer festgelegten Größe werden, unabhängig von einem Fluoreszenzsignal, für die Aufnahme registriert.

Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe können in ihren Emissionsspektren überlappen, sodass nicht nur jede Fluoreszenz für sich, sondern Fluoreszenzmischungen mit verschiedenen Farbstoffanteilen gemessen werden. Wird die Messung nicht korrigiert, können Zellen, die nur mit einem Farbstoff markiert sind, Mischsignale auf zwei Detektoren aufweisen. Um diesen Effekt zu vermeiden, erfolgt eine prozentuale Korrektur der Messdaten vor der Digitalisierung und Speicherung.

Die Auswertung der Datensätze kann mit Hilfe unterschiedlicher grafischer Darstellungen vorgenommen werden. Histogramme sind geeignet, um die Intensitätsverteilung einzelner Parameter eindimensional darzustellen und somit Häufigkeitsverteilungen auszudrücken. Eine weitere Möglichkeit zur Auswertung stellen zweidimensionale Dot-Plots (Punktwolkendarstellung) dar, bei denen auf der x- und y-Achse jeweils die Intensitätsverteilung von zwei Messparametern aufgetragen ist. Jede erfasste Zelle ist, entsprechend ihrer Intensität, als Punkt an einer x- und y-Position festgehalten. Diese Art der Darstellung lässt erkennen, ob von den untersuchten Zellen einzelne Messparameter gemeinsam oder unabhängig voneinander exprimiert werden und ob somit verschiedene Zellpopulationen nebeneinander bestehen. Zur Quantifizierung der Zellen kann der Dot-Plot mittels Quadrantenanalyse in vier Regionen unterteilt werden. In der Annahme, dass für jeden Parameter positive und negative Zellen existieren, werden in Form eines Kreuzes Schwellen auf der x- und y-Achse oberhalb der negativen Zellen gelegt. Anschließend wird die Anzahl der Zellen (siehe Abbildung 4), die für die analysierten Parameter doppelt positiv, doppelt negativ oder jeweils nur für einen Parameter positiv sind, ermittelt (Rothe 2007).

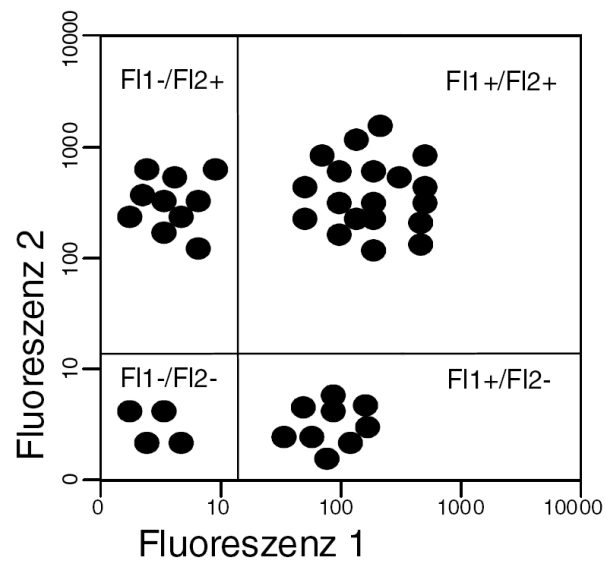


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Dot-Plots (Punktwolkendarstellung). Der Dot-Plot ermöglicht die Darstellung eines Zusammenhangs von Fluoreszenzsignalen. FL1= Fluoreszenz 1, FL2= Fluoreszenz 2 [modifiziert nach (Rothe 2007)].

4.3 Experimentelle Methoden

4.3.1 Herstellung verwendeter Lösungen

4.3.1.1 Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung, PBS)

Die Anwendung von PBS erfolgte aufgrund seiner puffernden Eigenschaften in Lösungen. Durch PBS wird ein konstanter pH-Wert von 7,4 in den Lösungen aufrechterhalten und ein osmotischer Druck erzeugt, der dem des Menschen nahe kommt. Zur Herstellung von 1L phosphatgepufferter Salzlösung wurden fünf PBS-Tabletten in ein entsprechendes Gefäß gegeben und deionisiertes Wasser bis zur 1 L-Markierung aufgefüllt. Anschließend erfolgten die Auflösung der Tabletten, die gründliche Durchmischung der Lösung sowie deren Lagerung bei Raumtemperatur.

4.3.1.2 FACS Lysing Solution (Lyselösung)

Um eine genaue durchflusszytometrische Analyse von Leukozyten durchzuführen, ist es von entscheidender Bedeutung, störende Zellen -bei vorliegender Untersuchung Erythrozyten- welche eine unspezifische Antikörperbindung bewirken, zu eliminieren. Aufgrund des Osmolaritätsunterschiedes der Lyselösung zum Blutplasma wurde ein hypotones Milieu in der Zellsuspension geschaffen. Dieses führte, bedingt durch die verminderte osmotische Widerstandsfähigkeit der Erythrozyten, zur deren selektiver Lyse. Gleichzeitig blieben die Leukozyten intakt. Zur Depletion der Erythrozyten aus dem EDTA-Vollblut kam FACS Lysing Solution der Firma Becton Dickinson in der Verdünnung 1:10 zur Anwendung. Dazu wurde aus 100 ml 10fach konzentriertem Lysereagenz und 900 ml Aqua ad iniectabilia 1 Liter Lyselösung hergestellt. Beide Reagenzien wurden gut miteinander vermischt und bei Raumtemperatur gelagert.

4.3.2 Gewinnung der Blutproben

Unter sterilen Bedingungen wurde jedem Probanden in üblicher Verfahrensweise 9 ml venöses Vollblut entnommen. Die dabei verwendeten Monovetten enthielten zur Gerinnungsprophylaxe EDTA, wodurch das Blut länger in analysierbarem Zustand blieb und sowohl für die FACS-Analyse, als auch für die Erstellung des Differentialblutbildes

mit dem Cell-Dyn 4000® genutzt werden konnte. Um eine mögliche Lysierung der Zellen zu vermeiden wurde das Blut gekühlt transportiert.

4.3.3 Erstellung des Differentialblutbildes

Für die Berechnung der Zellanzahl in der jeweils untersuchten Zellpopulation war es notwendig, eine Bezugsgröße zu den durchflusszytometrisch analysierten Daten zu ermitteln. Bei dieser Bezugsgröße handelte es sich um den Lymphozytenwert des Patienten/Probanden, da sich unter der Lymphozytenpopulation die -in der vorliegenden Arbeit untersuchten- Zellpopulationen befanden. In der Blutbank des Institutes für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Jena wurden pro Patient/Proband drei Differentialblutbilder mit dem Cell-Dyn 4000® der Firma Abbott erstellt. Aus den drei gemessenen Lymphozytenwerten wurde, für die abschließende Berechnung der Zellzahl, der Mittelwert berechnet, um eventuelle Messschwankungen des Hämatologie-Automaten auszugleichen.

Bei dem Abbott Cell-Dyn 4000® handelt es sich um die Kombination aus einem Flowzytometer und einem Hämatologie-Zählgerät. Nach selbstständigem Ansaugen der Blutprobe wird ein Teil der Probe (Aliquot) mit Diluent/Sheath-Flüssigkeit verdünnt und mit WBC-Reagenz gemischt. Es folgt die Lysierung der Erythrozyten bei 40 °C und die Markierung der Leukozyten mit erhöhter Permeabilität sowie der Normoblasten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid. Anschließend wird die Auszählung bzw. Differenzierung der Leukozyten vorgenommen. Dies geschieht flowzytometrisch, indem die Zellsuspension, von Diluent-Reagenz verdünnt, ummantelt und hydrodynamisch fokussiert, in der Durchflussküvette einen Argonlaser (488 nm) passiert. Somit wird jeder Leukozyt einmal, mittels dieses optischen Verfahrens, gemessen und differenziert (ABBOTT 1999). Die Steuerung des Cell-Dyn 4000® erfolgt computergestützt. Um die absolute Lymphozytenzahl pro Liter Blut zu definieren, muss der ausgegebene Lymphozytenwert mit 10^9 multipliziert werden. Die ermittelten Daten werden in tabellarischer Form auf dem Bildschirm angezeigt und können ausgedruckt werden.

4.3.4 Herstellung der Antikörperverdünnungen

4.3.4.1 Anti-CD34 und Isotypkontrolle IgG₁

In der Methodik der vorliegenden Arbeit wurde entsprechend den verwendeten Antikörpern jeweils eine Isotypkontrolle mitgeführt, da bei Antikörperfärbungen eine Analyse der Antikörperspezifität, d.h. der Anteile die nicht durch die reine Antigen-Antikörper-Interaktion, sondern durch unspezifische Bindungen an Fc-Rezeptoren hervorgerufen werden, erforderlich ist. Zur Isotypkontrolle wurde ein Antikörper des gleichen Isotyps -und somit der gleichen Affinität zu den Fc-Rezeptoren- entsprechend dem Antikörper für die eigentliche Probenfärbung, in gleicher Konzentration eingesetzt. Der Isotyp-Antikörper ist jedoch nicht in der Lage, spezifisch an humane Epitope zu binden.

Die optimale Verdünnung der Antikörper für die Zellpräparation wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Heike Reichelt in Verdünnungsreihen bestimmt. Bei dem -unter Punkt 4.3.5 beschriebenen- methodischen Ablauf wurde nach den von Heike Reichelt beschriebenen Antikörpermengen und Verdünnungen von Anti-CD34 und Anti-CD133 sowie deren Isotypkontrollen vorgegangen.

Es zeigte sich, dass bei der Verwendung von 10 µl unverdünntem CD34-Antikörper je Probengefäß die Absättigung aller Oberflächenantigene, der während der Probenpräparation isolierten Zellen, gegeben war. Dementsprechend wurden ebenfalls 10 µl Anti-Maus-IgG₁ unverdünnt zur Isotypkontrolle von Anti-CD34-FITC eingesetzt. Da zur höheren Zellausbeute für die Antikörperfärbung je Blutprobe zwei Reaktionsgefäße Verwendung fanden, wurden insgesamt 20 µl Anti-CD34 verbraucht.

4.3.4.2 Anti-CD133 und Isotypkontrolle IgG_{2b,k}

In den von Heike Reichelt durchgeführten Verdünnungsreihen konnte für Anti-CD133 festgestellt werden, dass bei einer Antikörperverdünnung von 1:5 Antikörper zu PBS, Anti-CD133 in ausreichender Konzentration vorlag, um die gesamten CD133-Epitope auf der Oberflächenmembran der präparierten Zellen zu besetzen. Zur Herstellung der Antikörperverdünnung wurden für eine Probe 84 µl Anti-CD133 und 16 µl PBS in einem Reaktionsgefäß gründlich miteinander vermischt. Für die Antikörperfärbung wurde das

Gesamtvolumen der Antikörperverdünnung von 20 µl gleichmäßig auf zwei Probengefäße aufgeteilt. Fand die Vorbereitung mehrerer Blutproben parallel zur Analyse statt, wurde eine größere Menge der Antikörperverdünnung bei gleichem Mischungsverhältnis nach einem festem Schema hergestellt.

Als Isotypkontrolle zu Anti-CD133 wurde der Antikörper Anti-Maus-IgG_{2b,k}-PE verwendet. Zur Erzeugung der Antikörperverdünnung von Anti-Maus-IgG_{2b,k} musste das Verdünnungsverhältnis der Konzentration der Anti-CD133-Verdünnung angepasst werden. Aufgrund der, mit 200 µg je ml PBS, 12fach höheren Konzentration von Anti-Maus-IgG_{2b,k} im Vergleich zu Anti-CD133 mit 16,7 µg je ml PBS, wurde Anti-Maus-IgG_{2b,k} im Verhältnis 1:60 mit PBS verdünnt. Dazu wurden 1 µl Anti-Maus-IgG_{2b,k} und 59 µl PBS in einem Reaktionsgefäß vermischt. Es resultierte daraus in den Verdünnungen von Anti-CD133 und Anti-Maus-IgG_{2b,k} die gleiche Antikörperkonzentration von 3,3 µg je ml PBS. Für die Isotypkontrolle wurden 10 µl der hergestellten Verdünnung je Blutprobe verbraucht. Die Antikörperverdünnungen wurden zeitnah zur eigentlichen Verwendung angefertigt und bei 4° Celsius im Dunklen gelagert.

4.3.4.3 Anti-VEGFR-2 und Streptavidin-Per-CP

Für die Antikörperfärbung mit Anti-VEGFR-2 wurde in einer durchgeführten Verdünnungsreihe die optimale Verdünnung von Anti-VEGFR-2, welche zur kompletten Absättigung aller auf den Zelloberflächen befindlichen Antigene notwendig ist, bestimmt. Das Mischungsverhältnis von Anti-VEGFR-2 zu PBS betrug 1:500. Nachdem das schonende Auftauen von Anti-VEGFR-2 bei 4° Celsius in Dunkelheit erfolgte, wurden zu 1 µl Antikörper 499 µl PBS in ein Reagenzgefäß gegeben, gründlich miteinander vermischt und 10 µl für jedes der beiden Probengefäße verwendet.

Der VEGFR-2-Antikörper allein führt zu keinem Fluoreszenzsignal, da dieser nur biotinyliert vorliegt. Aus diesem Grund ist es erforderlich in einem weiteren Arbeitsschritt Anti-VEGFR-2, nach dessen zellulären Bindung, mit dem fluoreszenzmarkierten Streptavidin-PerCP abzusättigen und somit ein Fluoreszenzsignal zu generieren. Des Weiteren wurde Streptavidin als Isotypkontrolle zu Anti-VEGFR-2 eingesetzt. Zur Herstellung der Verdünnung für eine Blutprobe wurden 8 µl Streptavidin und 32 µl PBS benötigt und sorgfältig miteinander vermischt. Jeweils 10 µl der Verdünnung wurden für

die zwei Probengefäße und 10 µl für Isotypkontrolle verbraucht. Die Verdünnungen wurden zeitnah zur ihrer bestimmten Verwendung hergestellt und bei 4° Celsius im Dunklen gelagert.

4.3.5 Methodisches Vorgehen bei der Zellextraktion

Zu Beginn der durchflusszytometrischen Analyse der Blutprobe wurden jeweils 300 µl venöses EDTA-Vollblut in je 14 Reaktionsgefäße pipettiert. Dabei wurden acht Reaktionsgefäße zur Anfärbung der Zellen mit den Antikörpern CD34, CD133 und VEGFR-2 vorbereitet (entspricht einem Gesamtblutvolumen je Blutprobe von 2,4 ml), vier Reaktionsgefäße für die Isotypenkontrolle (Gesamtblutvolumen je Blutprobe von 1,2 ml) und zwei Reaktionsgefäße für die Negativkontrolle (Gesamtblutvolumen je Blutprobe von 0,6 ml). Um eine spätere Verwechslung der Reaktionsgefäße auszuschließen, wurden diese eindeutig beschriftet.

Im Anschluss wurden 1,2 ml raumtemperierte FACS-Lyselösung den 300µl Blut je Probengefäß hinzugefügt und diese Suspension durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gründlich vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 2200 Umdrehungen pro Minute und 4° Celsius für 10 min zentrifugiert.

Da sich die Zentrifugationseinstellungen im gesamten Versuchsablauf nicht ändern, werden diese im Folgenden nicht mehr explizit genannt, sondern nur noch als „Zentrifugation“ bezeichnet.

Durch dieses Vorgehen bildete sich ein Überstand oberhalb des Zellsediments (Pellet), welcher nun vorsichtig abpipettiert und verworfen werden konnte. Es folgte die Aufsuspension des Zellsediments mit 1 ml Lyselösung sowie die Inkubation für weitere 7 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert. Durch die beschriebenen Arbeitsschritte konnten die Erythrozyten eliminiert werden, es resultierte ein weißes Zellsediment. Es folgten die erneute Entfernung des Überstandes sowie die Zugabe von 400 µl PBS in jedes Reaktionsgefäß und eine sorgfältige Vermischung der Zellen.

Anschließend wurde die Zellsuspension, durch die Zusammenfassung der Inhalte von jeweils vier Reaktionsgefäßen in ein Reaktionsgefäß, konzentriert. Aus diesem Vorgang

ergaben sich zwei Reaktionsgefäße für die Antikörperfärbung der Zellen und ein Gefäß für die Anfärbung der Isotypenkontrolle. Das Vorgehen bei der Negativkontrolle erfolgte prinzipiell in gleicher Weise. Zu den zwei Probengefäßen wurden jeweils 400 µl PBS zugegeben und diese konnten dann in einem Reaktionsgefäß zusammengefasst werden. Es folgte die Zentrifugation der Suspension. Zur Herstellung eines isotonen Milieus in der Zelllösung wurde der Überstand oberhalb des Zellsediments abpipettiert und nach Zugabe von 1 ml PBS gründlich aufsuspendiert. Dieser Vorgang wiederholte sich mehrfach im beschriebenen methodischen Ablauf und wird im Folgenden als „Waschen“ bezeichnet. Anschließend wurde erneut zentrifugiert.

Um unspezifische Antikörperbindungen an, sich auf der Zelloberfläche befindende, Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurden diese durch Zugabe und von 20 µl FcR Blocking Reagenz und 80 µl PBS je Reaktionsgefäß abgesättigt. Das Pellet wurde mit beiden Reagenzien gründlich aufsuspendiert und für 10 min im Kühlschrank bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension zweimalig gewaschen, anschließend jeweils zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Im anschließenden Arbeitsschritt erfolgte die Färbung der Proben mit den Antikörpern Anti-CD34, Anti-CD133 und Anti-VEGFR-2, sowie parallel die Färbung der Isotypkontrolle mit Anti-Maus-IgG₁ und Anti-Maus-IgG_{2b,κ}. Dazu wurden jeweils 10 µl Anti-CD34 unverdünnt, 10 µl Anti-CD133 1:5 mit PBS verdünnt und 10 µl Anti-VEGFR-2 1:500 verdünnt zu den Probengefäßen gegeben und das Pellet sorgfältig aufsuspendiert. Dem Reaktionsgefäß der Isotypkontrolle wurden je 10 µl Anti-Maus-IgG₁ unverdünnt sowie 10 µl Anti-Maus-IgG_{2b,κ} in einer Verdünnung von 1:60 mit PBS zugefügt und gründlich mit dem Zellsediment vermischt. Zur optimalen Markierung der Zellen wurden diese für 15 min, bei 4° Celsius in Dunkelheit inkubiert. Zweimaliges Waschen und Zentrifugieren der Zellsuspension, sowie die Entfernung des Überstandes schlossen sich an den erfolgten Färbevorgang an.

Anschließend erfolgte die Zugabe von Streptavidin-PerCP zu den Proben, um den biotinylierten Anti-VEGFR-2-Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff zu markieren. Streptavidin-PerCP wurde weiterhin als Isotypkontrolle zu Anti-VEGFR-2 verwendet. Dazu wurden jeweils 10 µl Streptavidin in einer Verdünnung von 1:5 mit PBS in die Reaktionsgefäße pipettiert und mit dem Pellet sorgfältig vermischt. Nach der

Inkubation der Zelllösung für 15 min bei 4° Celsius in Dunkelheit, konnten die Zellen erneut zweimal gewaschen sowie zentrifugiert werden, die Entfernung des Überstandes erfolgte jeweils.

Die Negativkontrolle wurde während des gesamten methodischen Ablaufes mitgeführt und allen beschriebenen Arbeitsschritten unterzogen. Allerdings erfolgte bei der Negativkontrolle keine Anfärbung mit den Antikörpern oder mit Streptavidin.

Nach dem letzten Waschvorgang erfolgte die Vorbereitung der präparierten Zellen für die FACS-Analyse. Zu beiden Probengefäßen wurden je 400 µl PBS gegeben, diese wurden anschließend in einem Analyseröhrchen zusammengefasst. Zur Isotypkontrolle und zur Negativkontrolle wurden je 600 µl PBS pipettiert und damit das Zellsediment sorgfältig aufsuspendiert. Es folgte ebenfalls die Überführung der jeweiligen Zellsuspension in ein Analyseröhrchen (BD Falcon™ 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube), welches eindeutig beschriftet wurde. Die Messung wurde innerhalb kurzer Zeit durchgeführt. Bis zur Analyse wurden die Probenröhrchen bei 4° Celsius im Kühlschrank gelagert.

4.3.6 Ablauf der durchflusszytometrischen Analyse

In Vorbereitung auf die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellsuspensionen erfolgte das Einschalten des FACSCalibur™-Durchflusszytometer etwa 30 min vor Messbeginn. Die Flussgeschwindigkeit des Probenstroms wurde auf „Medium“ (35 µl Probe/min) eingestellt und der Probendruckregler aktiviert. Vor Beginn der Messung wurden über das Computerprogramm CellQuest™-Pro der Firma BD Biosciences die, für die Analyse erforderlichen, Einstellungen (siehe Tabelle 5) vorgenommen.

Tabelle 5: Messeinstellungen des FACS zur Bestimmung der EPCs

Instrument Settings				
Cytometer Type: FACSCalibur				
Detector/Amps:				
Parameter	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E00	1.81	Lin
P2	SSC	396	1.06	Lin
P3	FI 1	550	1.00	Log
P4	FI 2	594	1.00	Log
P5	FI 3	647	1.00	Log

Zur Analyse wurde das jeweilige Analyseröhrchen unter der Messeinrichtung befestigt und der Messfuß nach vorn bewegt, bis dieser einrastete. Der „STANDBY“-Modus des Gerätes wechselte in den „RUN“-Modus und der Probenstrom setzte ein. Der Messvorgang wurde computergestützt gestartet. Zu Beginn erfolgte die Untersuchung der Negativkontrolle, dazu wurde die Messung kurz gestartet, eine geringe Anzahl der präparierten Zellen untersucht und die Messung gestoppt. In der FSC-SSC-Punktwolkendarstellung (Dotplot) konnten nun die einzelnen nativen Zellpopulationen der Leukozyten (siehe Abbildung 5) voneinander abgegrenzt werden.

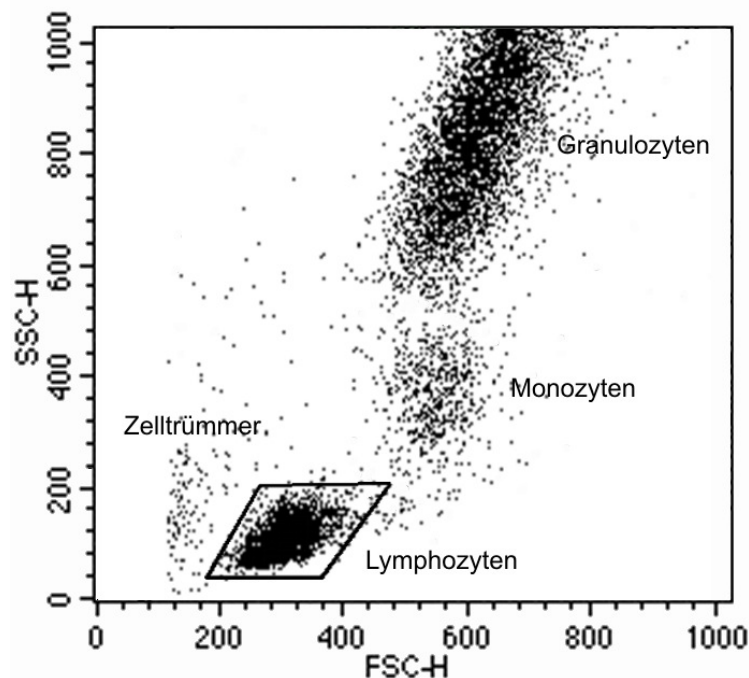


Abbildung 5: Darstellung der Leukozyten- Zellpopulationen im Dotplot. SSC = side scatter, FSC = forward scatter. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. H. Thude, Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Jena)

Es wurde um die Population der Lymphozyten ein Analyserahmen (sog. Gate) gelegt, welcher auch bei den nachfolgenden Fluoreszenzmessungen der Isotypkontrolle und der präparierten Zellen der Probe beibehalten wurde. Die -in dieser Weise auf die Zellen innerhalb des Lymphozytengates fokussierte- Messung wurde erneut gestartet. Es erfolgten die Auszählung von 50.000 Zellen (Total Events) innerhalb des Gates für die Negativkontrolle, sowie die Speicherung des Datensatzes für die spätere Auswertung des Messergebnisses.

Die Messungen der Isotypkontrolle und der fluoreszenzmarkierten Probe erfolgten in gleicher Weise wie oben beschrieben, mit dem Unterschied, dass für die Isotypkontrolle 150.000 Zellen im Lymphozytengate detektiert wurden. Bei der Bestimmung der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen wurde die Auszählung von 600.000 Zellen festgelegt, um eine größere Genauigkeit des Messergebnisses zu erzielen. In weiteren Arbeitsschritten konnten die so ermittelten und gespeicherten Daten unter verschiedenen Fragestellungen ausgewertet werden.

Nach Beendigung der Analyse schloss sich ein Reinigungsvorgang zur Beseitigung von Verunreinigungen durch die Probenlösungen an. Zuerst erfolgte die Desinfektion mit BD FACSTM Safe im „RUN“ –Modus für eine Minute bei hoher Durchflussgeschwindigkeit („high“ ~ 60 µlProbe/min) und anschließend für fünf Minuten im „RUN“ – Modus mit nach vorn geklapptem Messfuß. Dann wurde dieser Vorgang mit der Reinigungslösung BD FACSTM Rinse wiederholt. Nach Abschluss des Reinigungsprozesses wurde ein mit deionisiertem Wasser gefülltes Röhrchen unter der Messeinrichtung befestigt und das Durchflusszytometer ausgeschaltet.

4.3.7 Auswertung der ermittelten Daten

Die Auswertung der ermittelten und gespeicherten Datensätze schloss sich in einem zweiten Arbeitsschritt an. Dabei war es möglich unterschiedliche Messparameter für verschiedene Zellpopulationen oder Zellgruppen unter mehreren Gesichtspunkten zu untersuchen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Analyse der nachstehenden Zellpopulationen:

- CD34⁺ Zellen
- CD34⁺/CD133⁺ Zellen
- CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen

Um die Anzahl CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen zu bestimmen, wurde zunächst ein SSC-FL-1-Dotplot erstellt (siehe Abbildung 6), wobei der FITC-markierte Antikörper CD34 als FL-1 detektiert wurde. Die Zellen stellten sich als Punktwolke dar. Die Unterteilung der CD34⁺ Zellen und CD34⁻ Zellen erfolgte über die Anlage so genannter „Gates“ (Regionen; R1, R2, etc.), die zum einen die CD34⁺ Zellen (R1) und zum anderen

die CD34⁺ Zellen (R2) einschlossen. Bei jeder Messauswertung wurden die Gates identisch gelegt, um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Analysen zu erzielen. Über eine Regionenstatistik wurde die Anzahl der FL-1-positiven und -negativen Zellen angezeigt. Die Erstellung des FL-1-SSC-Dotplots war weiterhin erforderlich, um in einem nächsten Schritt die CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen zu ermitteln.

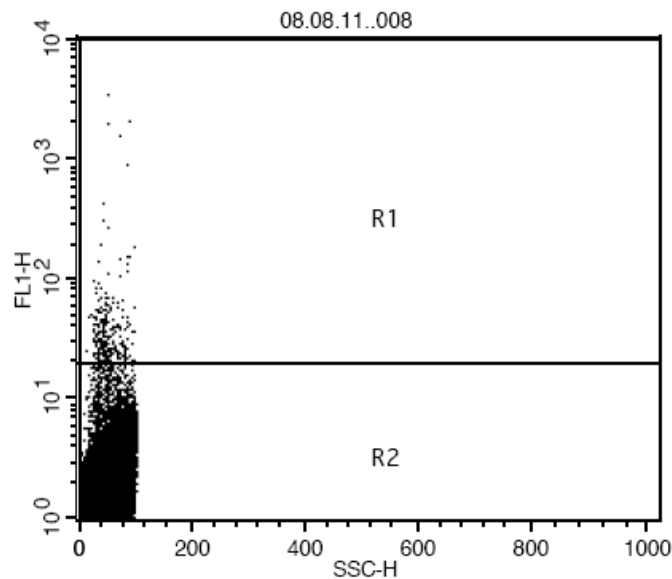


Abbildung 6: Beispiel eines Dotplot zur Erfassung der CD34⁺ Zellen. Es sind die Parameter FL-1 (entspricht CD34) und SSC aufgetragen und die CD34⁺ und CD34⁻ Zellen mittels zweier Regionen eingegrenzt. R1 umfasst die FL-1 positiven (CD34⁺) Zellen und R2 die FL-1 negativen (CD34⁻) Zellen. FL-1= Fluoreszenz 1, SSC= side scatter, R1 bzw. 2 = Region/ Gate 1 bzw. 2.

Anschließend wurden die CD34⁺ Zellen aus R1 in einem FL-2-FL-3-Dotplot ausgewertet. Die Zahl der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen konnte über eine Quadrantenanalyse ermittelt werden. Diese wurde in Form eines Fadenkreuzes im Dotplot platziert und unterteilt dieses in vier Quadranten: den oberen linken (upper left, UL), den oberen rechten (upper right, UR), den unteren rechten (lower right, LR) und den unteren linken (lower left, LL). Die für alle drei Fluoreszenzen positiven Zellen kamen im oberen rechten Quadranten zur Darstellung, wurden numerisch ausgegeben und konnten der Quadrantenstatistik als „Events UR“ entnommen werden (siehe Abbildung 7).

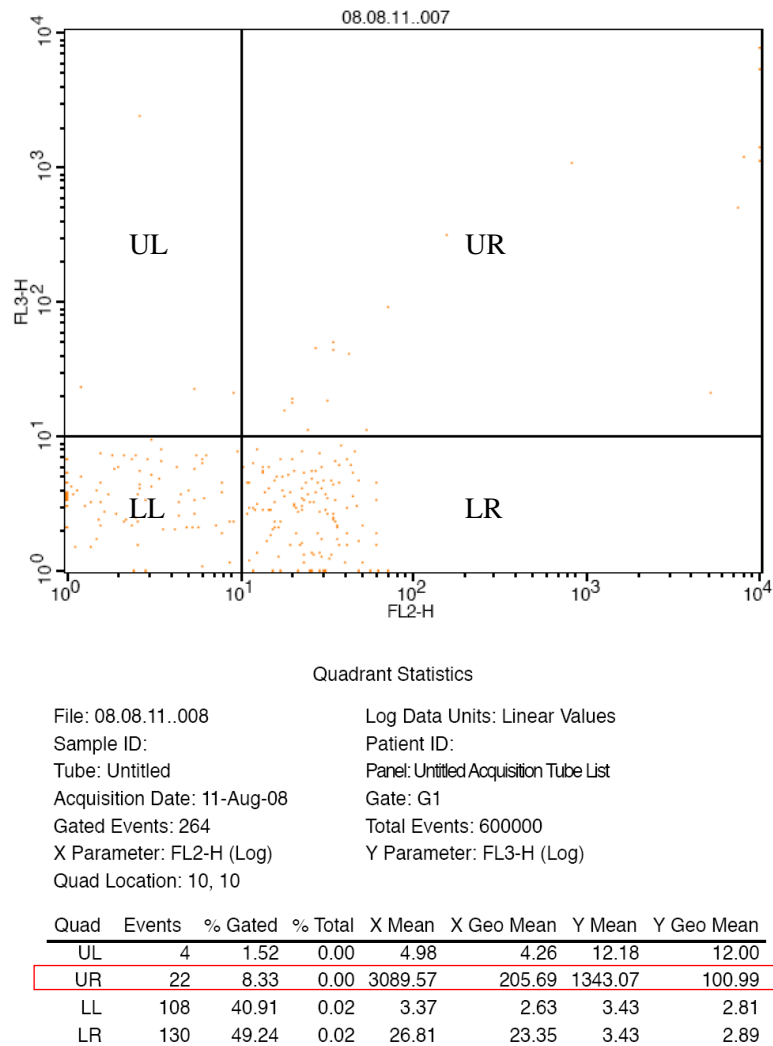
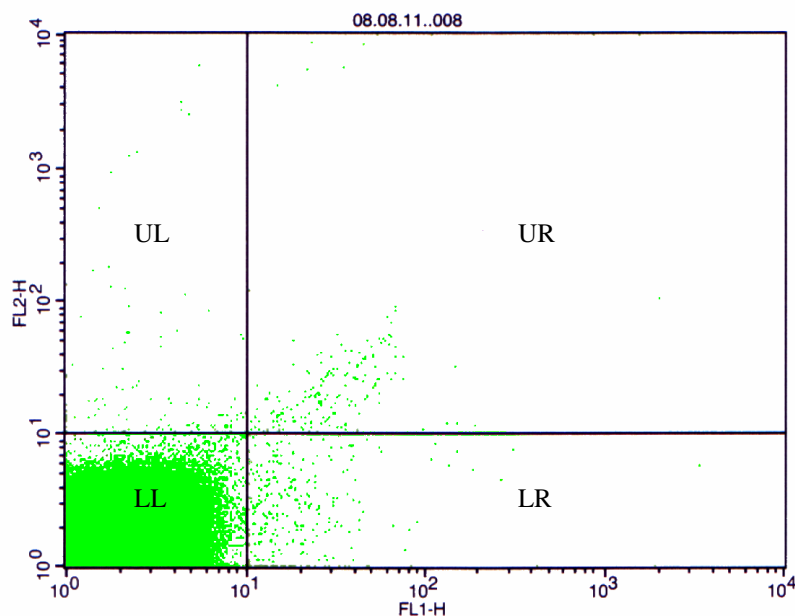


Abbildung 7: Beispiel eines FL-2-FL-3-Dotplots zur Analyse der $CD34^+/CD133^+/VEGFR-2^+$ Zellen mit entsprechender Ausgabe der Zellzahlen über die Quadrantenstatistik. Die für alle drei Fluoreszenzen positiven Zellen befinden sich im oberen rechten Quadrantenabschnitt (UR). FL-2= Fluoreszenz 2, FL-3= Fluoreszenz 3, LR= unterer rechter Quadrant, UL= oberer linker Quadrant, LL= unterer linker Quadrant.

Die Bestimmung der $CD34^+/CD133^+$ Zellen erfolgte über ein FL-1-FL-2-Dotplot. Hierbei wurden die durchflusszytometrisch ermittelten Zellen, die sowohl für CD34 (FL-1) als auch für CD133 (entspricht FL-2) positiv, sind in die Auswertung einbezogen. Die Abgrenzung der $CD34^+/CD133^+$ Zellen erfolgte mittels Quadrantenanalyse. Die hier relevante, doppelpositive Zellfraktion befand sich ebenfalls im oberen rechten Quadranten, wobei deren Anzahl über eine Quadrantenstatistik ausgegeben wurde (siehe Abbildung 8).



Quadrant Statistics

File: 08.08.11..008 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 11-Aug-08 Gate: No Gate
 Gated Events: 600000 Total Events: 600000
 X Parameter: FL1-H (Log) Y Parameter: FL2-H (Log)
 Quad Location: 10, 10

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	119	0.02	0.02	4.08	3.22	180.59	25.58
UR	198	0.03	0.03	57.08	31.34	385.99	27.65
LL	599377	99.90	99.90	1.84	1.68	1.64	1.50
LR	306	0.05	0.05	42.13	19.34	3.32	2.60

Abbildung 8: Beispiel eines FL-1-FL-2-Dotplots zur Bestimmung der CD34⁺/CD133⁺ Zellen. Die für die Auswertung relevanten FL-1 (CD34) und FL-2 (CD133) positiven Zellen befinden sich in UR. FL= Fluoreszenz, UR= oberer rechter Quadrant, LR= unterer rechter Quadrant, UL= oberer linker Quadrant, LL= unterer linker Quadrant.

4.3.8 Berechnung der Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden CD34⁺, CD34⁺/CD133⁺ und CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen

Die Berechnung der Absolutzahlen aller drei Zellpopulationen erfolgte mit den jeweils unterschiedlichen Zahlenwerten in gleicher Weise. Die über die Regionenstatistik bzw. Quadrantenstatistik ausgegebene Anzahl der CD34⁺ Zellen, der CD34⁺/CD133⁺ Zellen sowie der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen in der Region 1 oder dem jeweiligen oberen rechten Quadranten (UR) bezogen sich immer auf die Gesamtzahl aller detektierten Zellen

(„Total Events“, zum Beispiel 600.000 gemessene Zellen je Probenlösung). Diese wurden jeweils vom Benutzer vor der Messung festgelegt. Da sich dieser relative Wert nicht für den Vergleich der Messungen untereinander eignet, wurden die Absolutzellzahlen der CD34⁺ Zellen, der CD34⁺/CD133⁺ Zellen und der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen pro Liter Blut berechnet.

Dazu war es erforderlich, eine Bezugsgröße zu ermitteln. Als solche fungierte der Lymphozytenwert des jeweiligen Patienten/Probanden, da die oben beschriebenen Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation enthalten waren und während der FACS-Analyse mit Hilfe des Lymphozyten-Gates eingrenzt wurden. Der Wert der Lymphozyten wurde mit drei Differentialblutbildern bestimmt. Aus diesen ließ sich der Mittelwert berechnen (siehe Gliederungspunkt 4.3.3), welcher damit die Bezugsgröße für die Berechnung darstellte und in der SI-Einheit 10⁹/l angegeben wurde.

Mit nachstehender Formel wurde die Zellanzahl für die CD34⁺ Zellen, die CD34⁺/CD133⁺ Zellen und die CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen errechnet:

$$x \text{ (Zellzahl)}/l \text{ Blut} = \frac{\text{Zellzahl UR} * \text{Mittelwert Lymphozyten} * 10^9 / l}{\text{Zahl aller detektierten Zellen (Total Events)}}$$

1. Berechnung der im Blut zirkulierenden CD34⁺ Zellen exemplarisch an einem Beispiel:

Exemplarische Messwerte:

Zellzahl Region 1:	724
Total Events:	600.000
Mittelwert Lymphozyten * 10 ⁹ /l:	1,02 * 10 ⁹ /l

Berechnung:

$$x = \frac{724 * 1,02 * 10^9 / l}{600000}$$

$$x = \frac{7,38 * 10^{11} / l}{600000}$$

$$x = \underline{\underline{1.230.800 / l Blut}}$$

Aus der Berechnung dieses Beispiels wird ersichtlich, dass ein Liter Patientenblut 1.230.800 zirkulierende CD34⁺ Zellen beinhaltet.

2. Berechnung der im Blut zirkulierenden CD34⁺/CD133⁺ Zellen exemplarisch an einem Beispiel:

Exemplarische Messwerte:

Zellzahl UR:	470
Total Events:	600.000
Mittelwert Lymphozyten * 10 ⁹ /l:	1,02 * 10 ⁹ /l

Berechnung:

$$x = \frac{470 * 1,02 * 10^9 / l}{600000}$$

$$x = \frac{4,79 * 10^{11} / l}{600000}$$

$$x = \underline{\underline{799.000 / l Blut}}$$

Aus der Berechnung dieses Beispiels wird ersichtlich, dass ein Liter Patientenblut 799.000 zirkulierende CD34⁺/CD133⁺ Zellen beinhaltet.

3. Berechnung der im Blut zirkulierenden CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen exemplarisch an einem Beispiel:

Exemplarische Messwerte:

Zellzahl UR:	25
Total Events:	600.000
Mittelwert Lymphozyten * 10 ⁹ /l:	1,02 * 10 ⁹ /l

Berechnung:

$$x = \frac{25 * 1,02 * 10^9 / l}{600000}$$

$$x = \frac{2,55 * 10^{10} / l}{600000}$$

$$x = \underline{\underline{42.500 / l Blut}}$$

Aus der Berechnung dieses Beispiels wird ersichtlich, dass ein Liter Patientenblut 42.500 zirkulierende CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen beinhaltet.

4.3.9 Erhebung relevanter klinischer und laborchemischer Parameter

Zur Untersuchung von weiteren möglichen Einflussfaktoren auf die untersuchten Zellpopulationen wurden zusätzlich klinische und laborchemische Daten der Patienten erhoben. Zu diesen klinischen Parametern zählten die Ätiologie der Herzinsuffizienz wie die Dilatative Kardiomyopathie, Koronare Herzerkrankung bzw. vorangegangener Myokardinfarkt, hypertensive Herzerkrankung und Herzklappenvitien. Das Vorliegen bestehender Begleiterkrankungen, zu denen Diabetes mellitus und Niereninsuffizienz (GFR < 60 ml/min) zählten, wurde ebenso erfasst wie eine positive Raucheranamnese (aktueller Nikotinsonabusus oder Nikotinabusus in der Vergangenheit), die Einnahme von CSE-Hemmern (Cholesterol Synthese Enzym-Hemmer) und der Body-Mass-Index (BMI). Als laborchemischer Parameter wurde die Höhe der BNP-Konzentration im Patientenblut erfasst. Die beschriebenen Daten wurden für jeden Patienten aus dessen Krankenakte erhoben und flossen in die statistische Auswertung ein.

4.4 Statistische Methoden

4.4.1 Statistische Betrachtung der Kontroll- und Patientengruppen bezüglich der Häufigkeit der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Stammzellen

Ziel dieser statistischen Untersuchung war die Prüfung, ob sich die Anzahl der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Stammzellen der Kontrollgruppe von der Zellzahl der Patientengruppen unterscheidet. Die Patientengruppen waren anhand des Schweregrades der Herzinsuffizienz in vier Gruppen, entsprechend der NYHA-Klassifikation (I bis IV), unterteilt worden. Als geeignetes statistisches Verfahren wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt, da es sich um metrische Werte (Zellzahl) und zwei voneinander unabhängige Grundgesamtheiten (Kontroll-/Patientenkollektiv) handelte. Als Nullhypothese (H_0) wurde angenommen, dass sich die beiden Gruppen in Bezug auf die Größenordnung der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen nicht unterscheiden. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt. Es folgte jeweils der paarweise Vergleich der Kontrollgruppe mit einer der Patientengruppen, sodass vier Mann-Whitney-Tests durchgeführt und die Signifikanzen exakt berechnet werden konnten.

4.4.2 Statistische Betrachtung der Häufigkeitsbeeinflussung der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Stammzellen durch den Schweregrad der Herzinsuffizienz

Zur statistischen Untersuchung der Abhängigkeit der Anzahl der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen vom Schweregrad der Herzinsuffizienz kam als erster Berechnungsschritt der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Bei diesem Testverfahren handelte es sich um einen globalen Test, dessen Nullhypothese (H_0) zu Grunde legt, dass die Schwere der Herzinsuffizienz keinen Einfluss auf die Zahl der untersuchten Zellen ausübt. Das Signifikanzniveau lag bei $\alpha = 0,05$. Das Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests ließ nur die Aussage zu, ob die Höhe der NYHA-Klasse die Häufigkeit der Zellen beeinflusste oder nicht. Im Falle der Ablehnung von H_0 mit $p < \alpha$ wurde eine Signifikanz gesichert. In Folge dessen waren weitere statistische Berechnungen erforderlich, um die Unterscheidung der einzelnen NYHA-Klassen voneinander vorzunehmen.

Als weiterführender statistischer Test wurde der, bereits unter 4.4.1 beschriebene, Mann-Whitney-U-Test angewendet, da es sich bei dem Vergleich der einzelnen Patientengruppen erneut um jeweils zwei voneinander unabhängige Grundgesamtheiten handelte. Es wurde geprüft, ob die Anzahl der $CD34^+/CD133^+/VEGFR-2^+$ Zellen von der Höhe der NYHA-Klasse und somit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz abhängig war. Demzufolge wurden die Patientengruppen der vier NYHA-Klassen paarweise miteinander verglichen, unter Annahme von H_0 , die besagt, dass kein Unterschied zwischen den Häufigkeiten der Zellen in den einzelnen NYHA-Klassen bestand. Es wurden, um alle Gruppen miteinander zu vergleichen, sechs Mann-Whitney-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei $\alpha = 0,05$, die Berechnung der Signifikanzen erfolgte exakt.

Anschließend wurden die sechs ermittelten p-Werte der α -Adjustierung nach Holm unterzogen, um die Irrtumswahrscheinlichkeit geringstmöglich zu halten. Dabei wurden die einzelnen errechneten p-Werte der Größe nach aufsteigend, beginnend mit dem kleinsten p-Wert, sortiert und mit den Signifikanzschranken des Holm-Verfahrens verglichen (siehe Tabelle 6). Lag der zu vergleichende p-Wert -beginnend mit dem kleinsten Wert- beim Vergleich unterhalb der Signifikanzschranke, so konnte mit dem nächsten p-Wert in gleicher Weise fortgefahren werden, solange bis alle p-Werte getestet waren. Lag ein p-Wert oberhalb der Signifikanzschranke, musste die α -Adjustierung nach Holm abgebrochen werden.

Tabelle 6: Signifikanzschranken für das Holm-Verfahren (bezogen auf sechs durchgeführte Mann-Whitney-Tests)

Rangfolge der p-Werte	<i>1.</i>	<i>2.</i>	<i>3.</i>	<i>4.</i>	<i>5.</i>	<i>6.</i>
Signifikanzschranken für die p-Werte	$\alpha / 6$ (=0,008)	$\alpha / 5$ (=0,01)	$\alpha / 4$ (=0,013)	$\alpha / 3$ (=0,016)	$\alpha / 2$ (=0,025)	α (=0,05)

4.4.3 Statistische Betrachtung der zirkulierenden CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Stammzellen bei leichter und schwerer Herzinsuffizienz

Neben der Einschätzung des Schweregrades der Herzinsuffizienz anhand der NYHA-Klassifikation erfolgte eine weitere Einteilung der Erkrankung in eine leichte Form, welche sich zusammensetzte aus den NYHA-Gruppen I und II, sowie in eine schwere Form, bestehend aus den NYHA-Gruppen III und IV. Mit Hilfe dieser Schweregradeinteilung wurden die unterschiedlichen Größenordnungen der EPC-Zahlen in der Kontroll- und den Patientengruppen ebenso ermittelt, wie die Abhängigkeit der Zellzahl vom Ausprägungsgrad der Erkrankung. Die statistischen Berechnungen wurden, wie bereits unter den Punkten 4.4.1 und 4.4.2 beschrieben, mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei der Ermittlung der Abhängigkeit der EPC-Zahl vom Schweregrad der Herzinsuffizienz konnte in diesem Fall auf die α -Adjustierung nach Holm verzichtet werden, da im Vergleich der Ausprägungsgrade „Leicht“ und „Schwer“ nur ein p-Wert berechnet wurde. Getestet wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ und die p-Werte wurden exakt berechnet.

4.4.4 Statistische Betrachtung des Einfluss klinischer und laborchemischer Parameter auf die CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Stammzellen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen klinischen bzw. laborchemischen Parametern und der Anzahl der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Stammzellen zu untersuchen, wurde die lineare Regressionsanalyse angewendet. Als klinische Faktoren wurden die DCM, arterieller Hypertonus, Koronare Herzerkrankung, Diabetes mellitus, BMI, sowie das Lebensalter, der Schweregrad der Herzinsuffizienz und die Raucheranamnese einbezogen. Als laborchemischer Parameter ging der BNP-Wert der Patienten in die Analyse ein. Die Zahl der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen stellte die abhängige Variable dar. Die Berechnung der linearen Regressionsanalyse erfolgte exakt und nach der Rückwärtsmethode, bei der jeweils der Parameter mit dem geringsten Einfluss vor der nachfolgenden Berechnung eliminiert wurde.

4.4.5 Statistische Betrachtung der CD34⁺ und der CD34⁺/CD133⁺ Stammzellen

Die statistische Auswertung der CD34⁺ Zellen und der CD34⁺/CD133⁺ Zellen konnte analog der statistischen Betrachtungen der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Stammzellen erfolgen. Hierbei mussten nur die jeweils unterschiedlichen Zahlenwerte der genannten Zellpopulation beachtet werden.

Um statistisch zu prüfen, ob sich die Anzahl der CD34⁺ Zellen und der CD34⁺/CD133⁺ Zellen in der Kontrollgruppe von denen der - anhand des Schweregrades der Herzinsuffizienz eingeteilten - Patientengruppen (NYHA I-IV) signifikant unterschied, wurde entsprechend dem in Punkt 4.4.1 beschriebenen Verfahren vorgegangen. Die statistische Prüfung eines Zusammenhangs zwischen dem Schweregrad der Herzinsuffizienz und der Anzahl der CD34⁺ Zellen sowie der CD34⁺/CD133⁺ Zellen erfolgte in gleicher Weise, wie die in Punkt 4.4.2 beschriebene statistische Untersuchung der Abhängigkeit der Anzahl CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen von der Ausprägung der Herzinsuffizienz.

Alle durchgeführten statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS Version 15.0 ermittelt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Patienten- und Kontrollkollektives

Untersucht wurden in der vorliegenden Arbeit Blutproben von 111 ($n_p = 111$) männlichen herzinsuffizienten Patienten. Die Patientenstichprobe setzte sich aus Erkrankten der NYHA-Klasse I mit $n_1 = 32$, der NYHA-Klasse II mit $n_2 = 34$, der NYHA-Klasse III mit $n_3 = 35$ sowie der NYHA-Klasse IV mit $n_4 = 10$ zusammen. Der Altersdurchschnitt aller Patienten betrug 60 ± 13 Jahre. Aufgeschlüsselt auf die einzelnen Gruppen lag das Alter im Mittel in der NYHA-Klasse I bei 52 ± 12 Jahren, in der NYHA-Klasse II bei 61 ± 10 Jahren, in der NYHA-Klasse III bei 66 ± 11 Jahren und in der NYHA-Klasse IV bei 60 ± 15 Jahren.

Die Herzinsuffizienz im untersuchten Patientenkollektiv wurde mit 38% überwiegend dilatativ verursacht, 30% waren ischämischer und 22% hypertensiver Genese. Seltener Ursachen stellten die Myokarditis mit 6% sowie valvuläre Erkrankungen mit 4% dar. Als Begleiterkrankungen wiesen 32% aller Patienten einen Diabetes mellitus auf und 23% der Patienten litten an einer klinisch bedeutsamen Niereninsuffizienz ($GFR < 60$ ml/min). Der BMI aller Patienten lag durchschnittlich bei 29 ± 4 und schwankte nur unbedeutend in den einzelnen NYHA-Klassen. Anamnestisch konnte eruiert werden, dass 66% aller Patienten rauchten bzw. ein Nikotinabusus in der Vergangenheit vorgelegen hatte. 38% der Probanden wurden im Rahmen ihrer kardiologischen Erkrankung mit einem CSE-Hemmer therapiert.

Als laborchemischer Parameter der Herzinsuffizienz wurde der BNP-Wert jedes Patienten untersucht. Dieser lag als Median in der Gesamtheit der Patienten bei 281 pg/ml. Unter Verstärkung der Herzinsuffizienz war eine Zunahme des BNP zu verzeichnen. So wies die NYHA-Klasse I einen Median von 106 pg/ml auf, die NYHA-Klasse II einen Median von 236 pg/ml, die NYHA-Klasse III einen Median von 883 pg/ml und die NYHA-Klasse IV einen Median von 1029 pg/ml auf.

Das Kontrollkollektiv umfasste 41 ($n_k = 41$) Probanden. Es wurden, entsprechend der Patientengruppe, Blutproben ausschließlich männlicher Personen untersucht. Hierbei handelte es sich um gesunde Blutspender, weshalb eine Krankheitsanamnese nicht zu erheben war. Das Alter der Probanden in der Kontrollgruppe lag durchschnittlich bei 32 ± 8 Jahren.

In der Tabelle 7 sind zusammenfassend die Charakteristika der Kontrollgruppe und der Patientengruppen dargestellt.

Tabelle 7: Charakterisierung der Patienten- und Kontrollgruppe

	<i>Kontrolle</i> $n_k = 41$	<i>Patienten</i> $n_p = 111$	<i>NYHA I</i> $n_1 = 32$	<i>NYHA II</i> $n_2 = 34$	<i>NYHA III</i> $n_3 = 35$	<i>NYHA IV</i> $n_4 = 10$
Alter (in Jahren)	32 ± 8	60 ± 13	52 ± 12	61 ± 10	66 ± 11	60 ± 15
BMI	Daten Ø vorliegend	29 ± 4	29 ± 5	29 ± 5	29 ± 5	31 ± 4
Ätiologie (n/%)						
DCM	Entfällt	42 (38%)	16 (50%)	16 (47%)	6 (17%)	4 (40%)
Ischämische Herzerk.	Entfällt	34 (30%)	5 (16%)	9 (26%)	17 (49%)	3 (30%)
Hypertensive Herzerk.	Entfällt	24 (22%)	7 (22%)	7 (21%)	8 (23%)	2 (20%)
Myokarditis	Entfällt	7 (6%)	3 (9%)	1 (3%)	2 (6%)	1 (10%)
Herzklappenvitium	Entfällt	4 (4%)	1 (3%)	1 (3%)	2 (6%)	0
Rauchen (n)	Daten Ø vorliegend	73 (66%)	24 (75%)	18 (53%)	25 (71%)	6 (60%)
Diabetes mellitus (n)	Entfällt	36 (32%)	4 (13%)	15 (44%)	13 (37%)	4 (40%)
Niereninsuffizienz (n)	Entfällt	26 (23%)	4 (13%)	5 (15%)	11 (31%)	6 (60%)
Statintherapie (n)	Entfällt	42 (38%)	5 (16%)	14 (41%)	21 (60%)	2 (20%)
BNP (pg/ml; Median)	Entfällt	281	106	236	883	1029

Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. der Anzahl der Patienten und deren prozentualer Anteil. BMI = Body Mass Index, BNP= natriuretisches Peptid Typ B, DCM= Dilatative Cardiomyopathie, NYHA= New York Heart Association.

5.2 Betrachtung der peripher zirkulierenden CD34⁺ Stammzellen

5.2.1 Häufigkeitsverteilung der zirkulierenden CD34⁺ Stammzellen in der Kontroll- und den Patientengruppen

Die vorliegende Arbeit erfasst in der Grundgesamtheit aller herzinsuffizienten Patienten und der Kontrollgruppe drei Zellpopulationen, die, zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit, auf gleiche Weise analysiert wurden. Zu Beginn erfolgte die statistische Auswertung der CD34⁺ Zellen. Die Einteilung der Patienten wurde zum einen anhand der NYHA-Klassifikation vorgenommen, zum anderen in eine leichte (bestehend aus NYHA I und II) und in eine schwere Form (bestehend aus NYHA III und IV) eingeteilt. Bei den Zahlenwerten der hier betrachteten CD34⁺ Stammzellpopulation liegt keine Normalverteilung vor (siehe Abbildung 9), sodass bei der Beschreibung der Häufigkeitsverteilung als statistisches Maß der Median angegeben wurde. Allerdings wird in der Literatur der Mittelwert (MW) zur Beschreibung der Häufigkeiten zum Teil angegeben, weshalb dieser im Folgenden ebenfalls mit aufgeführt wird, um einen besseren Vergleich zu ermöglichen (siehe Tabelle 8).

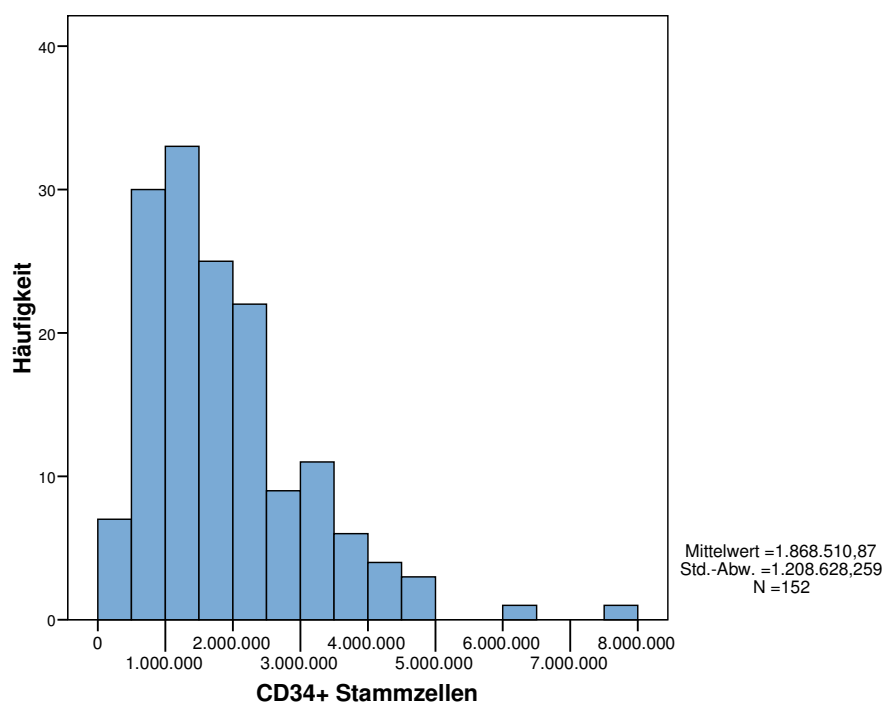


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der CD34⁺ Stammzellen der Grundgesamtheit aller Messwerte als Histogrammdarstellung.

Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung der peripher zirkulierenden CD34⁺ Zellen je Liter Blut in der Kontrollgruppe und den Patientengruppen (insgesamt und NYHA I-IV).

	<i>Kontrolle</i>	<i>Patienten</i>	<i>NYHA I</i>	<i>NYHA II</i>	<i>NYHA III</i>	<i>NYHA IV</i>
CD34⁺ Zellen /l Blut						
Mittelwert ± Standartabweichung	5.560.915 ± 1.910.338	1.628.137 ± 1.130.966	2.023.116 ± 1.604.016	1.563.763 ± 914.212	1.486.061 ± 811.901	1.080.346 ± 483.860
Median	2.217.500	1.279.800	1.690.192	1.220.807	1.332.897	858.970

Aus den Daten der Tabelle 8 wird ersichtlich, dass die Häufigkeit der CD34⁺ Zellen der Kontrollgruppe (Median: 2.217.500 Zellen/l Blut bzw. MW: 5.560.915 ± 1.910.338 Zellen/l Blut) die der gesamten Patientenstichprobe (Median: 1.279.800 Zellen/l Blut bzw. MW: 1.628.137 ± 1.130.966 Zellen/l Blut) um etwa das 1,5fache übersteigt. Im Vergleich des Kontrollkollektives mit den NYHA-Klassen zeigt sich auch hier, dass deren Zellhäufigkeit deutlich über der Zellanzahl der Patientengruppen liegt. Betrachtet man die einzelnen Herzinsuffizienzstadien so fällt auf, dass mit Zunahme der Erkrankung die Häufigkeit der CD34⁺ Stammzellen abnimmt. Während in NYHA-Klasse I 1.690.192 (MW: 2.023.116 ± 1.604.016) Zellen je Liter Blut vorliegen, fällt deren Anzahl kontinuierlich über NYHA-Klasse II mit 1.220.807 (MW: 1.563.763 ± 914.212) Zellen je Liter Blut und NYHA-Klasse III mit 1.332.897 (MW: 1.486.061 ± 811.901) Zellen je Liter Blut auf die geringste Anzahl von 858.970 (MW: 1.080.346 ± 483.860) Zellen je Liter Blut in NYHA-Klasse IV (siehe Abbildung 10).

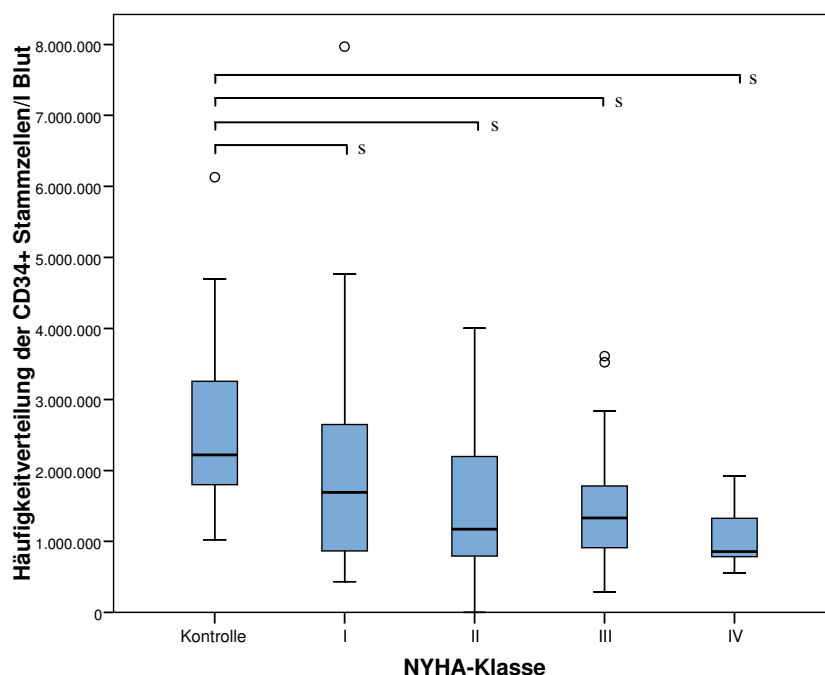


Abbildung 10: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der peripher zirkulierenden CD34⁺ Stammzellen in den Patientenstichproben NYHA I-IV und in der Referenzgruppe als Boxplot. Die Kennzeichnung mit ^s erfolgte bei statistisch signifikanter Unterscheidung der Stichproben. Die mit ^o gekennzeichneten Beobachtungseinheiten sind als Werte mit großem Abstand zur Box („Ausreißer“) zu betrachten.

Der Anteil der CD34⁺ Stammzellen innerhalb der Population der Lymphozyten und Leukozyten der Patienten und Probanden beträgt durchschnittlich in NYHA-Klasse I 0,12% bzw. 0,031%, in NYHA-Klasse II 0,1% bzw. 0,023%, in NYHA-Klasse III 0,1% bzw. 0,019% und in NYHA-Klasse IV 0,11% bzw. 0,012%. In der Kontrollgruppe sind 0,32% der Lymphozyten und 0,09% der Leukozyten CD34 positive Stammzellen.

Im Rahmen der weiteren statistischen Untersuchung wurde festgestellt, ob eine statistische Unterscheidung bezüglich der Häufigkeit der CD34⁺ Stammzellen zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen getroffen werden kann. Dazu wurden vier paarweise Vergleiche der Kontrollgruppe mit jeweils einer Patientengruppe durchgeführt und mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests der entsprechende p-Wert exakt ermittelt. Getestet wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

Die berechneten p-Werte weisen darauf hin, dass sich die Kontrollgruppe signifikant von allen Patientengruppen abhebt. Es wurde für die NYHA-Klasse I ein p-Wert von $p = 0,008$, für die NYHA-Klasse II $p < 0,001$, für die NYHA-Klasse III $p < 0,001$ sowie für die

NYHA-Klasse IV $p < 0,001$ errechnet (siehe Tabelle 9 und Verweis auf Abbildung 10). Dieses Ergebnis lässt die Aussage zu, dass das gesunde Probandenkollektiv über eine statistisch signifikant größere Anzahl an $CD34^+$ Stammzellen verfügt, als die erkrankten Personen der einzelnen NYHA-Klassen.

Tabelle 9: Statistische Ergebnisse des paarweisen Vergleiches der peripher zirkulierenden $CD34^+$ Zellen in der Kontroll- und den Patientengruppen.

<i>Paarweiser Vergleich im Mann-Whitney-U-Test</i>	<i>Berechneter p-Wert</i>
Kontrolle vs. NYHA I	$p = 0,008$
Kontrolle vs. NYHA II	$p < 0,001$
Kontrolle vs. NYHA III	$p < 0,001$
Kontrolle vs. NYHA IV	$p < 0,001$

5.2.2 Abhängigkeit der Häufigkeit der zirkulierenden $CD34^+$ Stammzellen vom Ausprägungsgrad der Herzinsuffizienz

Weiterhin wurde die Fragestellung untersucht, inwieweit der Schweregrad der Herzinsuffizienz, im Sinne der NYHA-Klassifikation, einen Einfluss auf die Größenordnung der $CD34^+$ Stammzellen ausübt. Bevor die NYHA-Klassen einzeln untersucht werden konnten, war es erforderlich, einen globalen statistischen Test -den Kruskal-Wallis-Test- anzuwenden, um zu eruieren, ob sich die Häufigkeiten der $CD34^+$ Stammzellen innerhalb der vier Patientengruppen global unterscheiden. Es wurde auf dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ getestet.

Der mittels dem Kruskal-Wallis-Test ermittelte p-Wert lag bei $p = 0,267$. Somit zeigte diese Berechnung kein statistisch signifikantes Ergebnis, welches darauf hindeutet, dass eine Unterscheidung der NYHA-Klassen aufgrund ihrer $CD34^+$ Zellenzahl zulässig ist. Aus diesem Grund erfolgte keine weitere Untersuchung der einzelnen NYHA-Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test. Dennoch lässt sich die Aussage treffen, dass sich tendenziell mit

Zunahme der NYHA-Klasse die Häufigkeit der CD34⁺ Stammzellen verringert (Verweis auf Abbildung 10).

5.2.3 Betrachtung der zirkulierenden CD34⁺ Stammzellen bei leichter und schwerer Herzinsuffizienz

Wurde die Herzinsuffizienz in die Gruppen leicht und schwer unterteilt, so setzten sich diese aus den NYHA-Klassen I und II (n = 66) sowie III und IV (n = 45) zusammen. Es wird bei dieser statistischen Untersuchung deutlich, dass Patienten mit der milden Erkrankungsform, verglichen mit den schwer erkrankten Personen, im Mittel eine nur sehr diskret erhöhte Zellzahl aufweisen. Die Anzahl der peripheren CD34⁺ Zellen je Liter Blut liegt bei der leichten Herzinsuffizienz bei 1.324.575 (MW: 1.767.418 ± 1.322.622) und bei der schweren Form bei 1.269.778 (MW: 1.395.902 ± 765.737) (siehe Tabelle 10 und Abbildung 11).

Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung der peripheren CD34⁺ Zellen je Liter Blut bei leichter und schwerer Herzinsuffizienz.

	<i>Leichte Herzinsuffizienz</i> n = 66	<i>Schwere Herzinsuffizienz</i> n = 45
CD34⁺ Zellen /l Blut		
Mittelwert ± Standartabweichung	1.767.418 ± 1.322.622	1.395.902 ± 765.737
Median	1.324.575	1.269.778

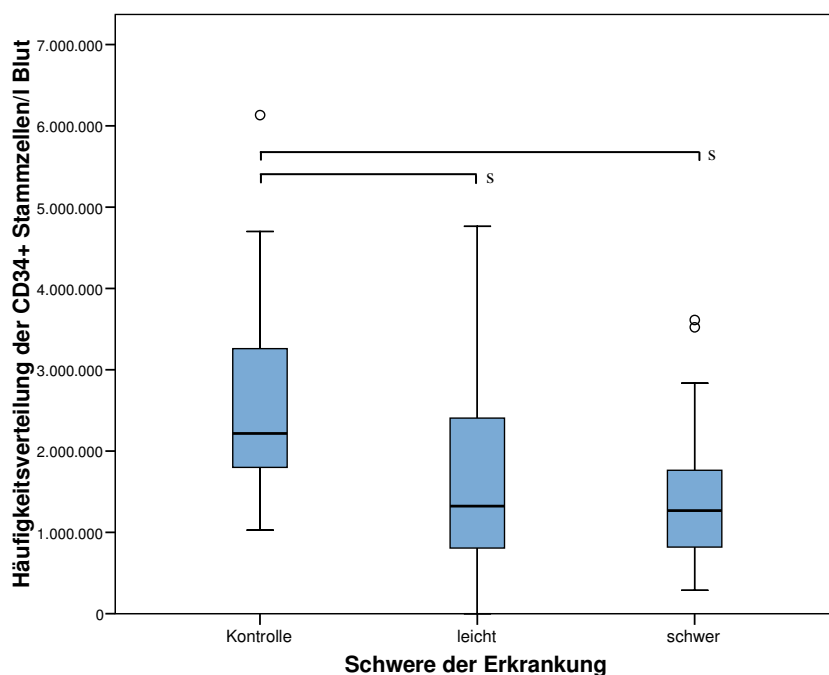


Abbildung 11: Grafische Darstellung der Häufigkeitsverteilung und Gegenüberstellung der zirkulierenden CD34⁺ Stammzellen in der Kontrollgruppe sowie bei leichter und schwerer Herzinsuffizienz als Boxplot. Die Kennzeichnung mit ^s erfolgte bei signifikanter Unterscheidung der Stichproben. Die mit ^o gekennzeichneten Beobachtungseinheiten sind als Werte mit großem Abstand zur Box („Ausreißer“) zu betrachten.

Anhand dieser Einteilung wurde auch der Einfluss des Schweregrades der Herzinsuffizienz auf die Häufigkeitsverteilung der CD34⁺ Zellen in den Patientengruppen und der Referenzgruppe statistisch geprüft. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für die paarweisen Vergleiche der Kontrollgruppe mit der jeweiligen Patientengruppe und der Patientengruppen untereinander herangezogen.

Bei der Gegenüberstellung der Kontrolle mit der Gruppe der leichten Herzinsuffizienzpatienten ergab sich ein p-Wert von $p < 0,001$ und bei dem Vergleich der Kontrolle mit der Gruppe der schweren Herzinsuffizienz ein $p < 0,001$. Der paarweise Vergleich der leichten und schweren Herzinsuffizienz zeigte ein $p = 0,296$ (siehe Tabelle 11).

Daraus lässt sich ein Unterschied bezüglich der Häufigkeiten der CD34⁺ Stammzellen zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten ablesen. Sowohl die leichte, als auch die schwere Form der Herzinsuffizienz unterscheiden sich

hinsichtlich ihrer Anzahl der CD34⁺ Zellen signifikant von der Kontrollgruppe. Die Zellzahl der Kontrolle liegt signifikant oberhalb derer der herzinsuffizienten Patienten. Bei dem Vergleich der Schweregrade der Herzerkrankung untereinander konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis gesichert werden. Eine Tendenz, dass mit zunehmender Herzinsuffizienz die Zahl der CD34⁺ Zellen abnimmt, lässt sich jedoch erkennen (Verweis auf Abbildung 11).

Tabelle 11: Statistische Ergebnisse des Vergleichs der CD34⁺ Stammzellen zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit der leichten und der schweren Form der Herzinsuffizienz, sowie dieser Patientengruppen untereinander.

<i>Paarweiser Vergleich im Mann-Whitney-U-Test</i>	<i>Errechneter p-Wert</i>
Kontrolle vs. Leicht	p < 0,001
Kontrolle vs. Schwer	p < 0,001
Leicht vs. Schwer	p = 0,296

5.3 Betrachtung der peripher zirkulierenden CD34⁺CD133⁺ Stammzellen

5.3.1 Häufigkeitsverteilung der zirkulierenden CD34⁺CD133⁺ Stammzellen in der Kontroll- und den Patientengruppen

Neben den CD34⁺ Stammzellen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die CD34⁺CD133⁺ Stammzellen in der Stichprobe der Patienten sowie der gesunden Probanden mit dem FACS analysiert. Wie bereits geschildert, erfolgte die Einteilung der Erkrankten zum einen anhand der NYHA-Klassifikation, zum anderen in eine leichte und in eine schwere Form der Herzinsuffizienz. Die Verteilung der Messwerte der CD34⁺CD133⁺ Stammzellpopulation entspricht nicht der Normalverteilung (siehe Abbildung 12), sodass die Häufigkeiten mit dem Median als statistisches Maß beschrieben werden. Da in der Literatur zum Teil der Mittelwert (MW) zur Beschreibung der Zellhäufigkeiten genutzt wird, ist dieser in der vorliegenden Arbeit jeweils mit angegeben, um einen Vergleich zu ermöglichen (siehe Tabelle 12).

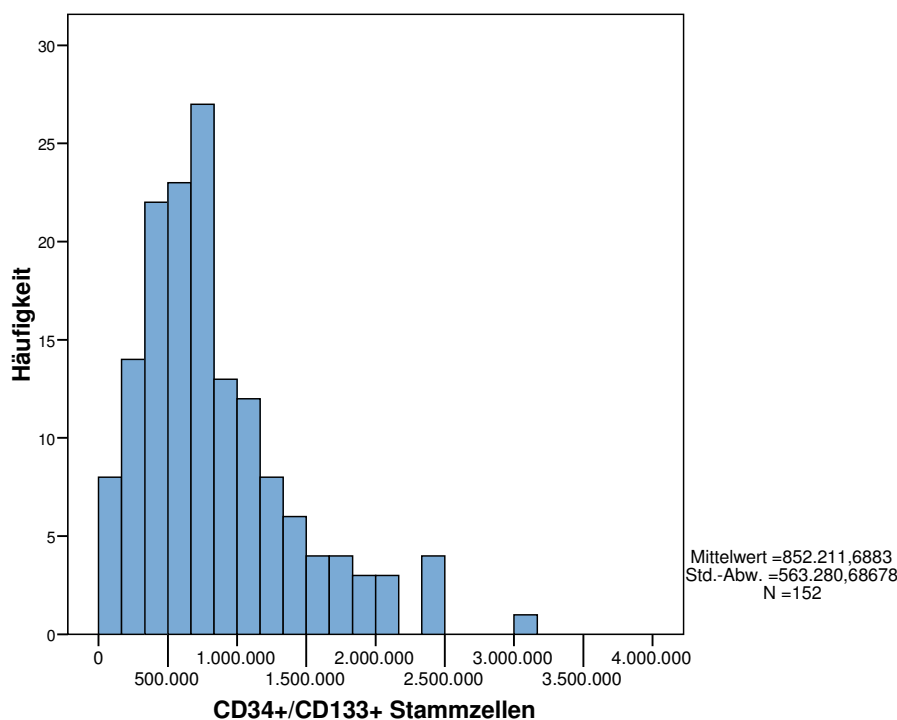


Abbildung 12: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Messwerte der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen in der Gesamtheit der Patienten- und Probandenpopulation als Histogramm.

Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung der peripher zirkulierenden CD34⁺CD133⁺ Stammzellen je Liter Blut in der Kontrollgruppe und den Patientengruppen.

	<i>Kontrolle</i>	<i>Patienten</i>	<i>NYHA I</i>	<i>NYHA II</i>	<i>NYHA III</i>	<i>NYHA IV</i>
CD34⁺CD133⁺ Zellen /l Blut						
Mittelwert ± Standartabweichung	1.164.435± 481.797	736.886 ± 548.980	948.112 ± 696.809	774.161 ± 561.735	615.263 ± 330.176	359.907 ± 250.891
Median	1.073.500	598.483	640.916	610.768	608.222	332.824

Die in Tabelle 12 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Häufigkeit der CD34⁺CD133⁺ Zellen in der Kontrollpopulation (Median: 1.073.500, MW: 1.164.435 ± 481.797 Zellen je Liter Blut) im Vergleich zur gesamten Patientenstichprobe (Median: 598.483, MW: 736.886 ± 548.980 Zellen je Liter Blut) etwa um das 1,5fache erhöht ist. In der direkten Gegenüberstellung der NYHA-Klassen mit der Kontrollgruppe zeigt sich ebenfalls ein erhöhtes Vorkommen der CD34⁺CD133⁺ Zellen in der Referenzgruppe. Weiterhin lässt sich feststellen, dass mit Zunahme des Schweregrades der Herzerkrankung die Häufigkeit der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen kontinuierlich abnimmt. Die Zellzahl in NYHA-Klasse I beträgt 640.916 (MW: 948.112 ± 696.809) Zellen je Liter Blut, in NYHA-Klasse II 610.768 (MW: 774.161 ± 561.735) Zellen je Liter Blut, in NYHA-Klasse III 608.222 (MW: 615.263 ± 330.176) Zellen je Liter Blut und erreicht in NYHA-Klasse IV mit 332.824 (MW: 359.907 ± 250.891) Zellen je Liter Blut ihren tiefsten Wert.

Bezieht man die Anzahl der CD34⁺CD133⁺ Zellen auf die Lymphozyten- bzw. die Leukozytenpopulation der Patienten und Probanden, so ergibt sich für die NYHA-Klasse I ein Anteil von 0,054% bzw. 0,015%, für NYHA-Klasse II ein Anteil von 0,051% bzw. 0,011%, für NYHA-Klasse III 0,039% bzw. 0,008% und für NYHA-Klasse IV 0,038% bzw. 0,004%. In der Referenzgruppe lag der Anteil der CD34⁺CD133⁺ Zellen an den Lymphozyten bei 0,067% und an den Leukozyten bei 0,018%.

Im Rahmen der statistischen Untersuchung wurde weiterhin analysiert, ob ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Häufigkeiten der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen zwischen der

Kontrollgruppe und den Patientengruppen besteht. Vier paarweise Vergleiche der Kontrollgruppe mit jeweils einer Patientengruppe wurden durchgeführt und mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests der entsprechende p-Wert ermittelt. Getestet wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Der Berechnung der p-Werte ist zu entnehmen, dass sich die Kontrollgruppe signifikant bezüglich der Häufigkeit der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen von den Patientengruppen unterscheidet. Folgende p-Werte wurden ermittelt: NYHA I $p = 0,013$, NYHA II $p < 0,001$, NYHA III $p < 0,001$ sowie NYHA IV $p < 0,001$ (siehe Tabelle 13 und Verweis auf Abbildung 13). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die gesunde Kontrollgruppe eine signifikant höhere Anzahl CD34⁺CD133⁺ Stammzellen aufweist als an Herzinsuffizienz erkrankte Patienten in jedem NYHA-Stadium.

Tabelle 13: Statistische Ergebnisse des paarweisen Vergleiches der Häufigkeit der CD34⁺CD133⁺ Zellen in der Kontroll- und den Patientengruppen.

<i>Paarweiser Vergleich im Mann-Whitney-U-Test</i>	<i>Berechneter p-Wert</i>
Kontrolle vs. NYHA I	$p = 0,013$
Kontrolle vs. NYHA II	$p < 0,001$
Kontrolle vs. NYHA III	$p < 0,001$
Kontrolle vs. NYHA IV	$p < 0,001$

5.3.2 Abhängigkeit der Häufigkeit der zirkulierenden CD34⁺CD133⁺ Stammzellen vom Ausprägungsgrad der Herzinsuffizienz

Weiterhin wurde geprüft, welchen Einfluss der Schweregrad der Herzinsuffizienz auf die Häufigkeit der CD34⁺CD133⁺ Zellen ausübt. Zunächst wurde der globale Kruskal-Wallis-Test angewendet, um eine statistische Unterscheidung der Zellhäufigkeit innerhalb der verschiedenen NYHA-Klassen zu sichern. Der hierdurch ermittelte Wert lag bei $p = 0,013$. Somit war es möglich, die NYHA-Klassen einzeln zu vergleichen. Anschließend wurde statistisch mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft und die einzelnen NYHA-Gruppen miteinander paarweise verglichen. Daraus resultieren sechs Vergleiche mit den jeweils ermittelten p-Werten, die dann der α -Adjustierung nach Holm unterzogen wurden. Bei

dieser wurden die errechneten p-Werte aufsteigend, beginnend mit dem niedrigsten Wert, sortiert und mit den Signifikanzschranken nach Holm verglichen. Sobald ein p-Wert über der entsprechenden Signifikanzschranke lag, musste die α -Adjustierung nach Holm abgebrochen werden (Verweis auf Tabelle 6).

Bei der Gegenüberstellung der einzelnen Erkrankungsstadien zeigte sich, dass ein statistisch signifikanter Häufigkeitsunterschied der CD34⁺CD133⁺ Zellen zwischen den Klassen I und IV mit $p = 0,002$, sowie zwischen den Klassen II und IV mit $p = 0,003$ besteht. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass in den NYHA-Klassen I und II statistisch signifikant mehr CD34⁺CD133⁺ Stammzellen auftreten, als in der NYHA-Klasse IV. Auch zwischen den Klassen III und IV ($p = 0,031$) lag nach dem Mann-Whitney-U-Test eine statistische Signifikanz vor, allerdings musste diese nach dem Vergleich mit der Signifikanzschranke nach Holm abgewiesen werden. Die weiteren Berechnungen ergaben keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Bei den Vergleichen der Klassen I und II wurde ein p-Wert von $p = 0,448$ ermittelt, beim Vergleich der Klassen I und III ein Wert von $p = 0,102$ und bei den Klassen II und III ein Wert von $p = 0,674$. Dennoch ist in der Tendenz ein leichter Abfall der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen mit zunehmendem Schweregrad der Herzinsuffizienz erkennbar, mit Ausnahme des Übergangs der NYHA-Klassen II zu III (siehe Tabelle 14 und Abbildung 13).

Tabelle 14: Darstellung der Ergebnisse der statistischen Vergleiche der einzelnen NYHA-Klassen untereinander in Bezug auf die Häufigkeit der CD34⁺CD133⁺ Zellen.

<i>Paarweiser Vergleich der NYHA-Klassen mit dem Mann-Whitney-U-Test</i>	<i>Errechneter p-Wert</i>
NYHA I vs. II	$p = 0,448$
NYHA I vs. III	$p = 0,102$
NYHA I vs. IV	$p = 0,002$
NYHA II vs. III	$p = 0,674$
NYHA II vs. IV	$p = 0,003$
NYHA III vs. IV	$p = 0,031$

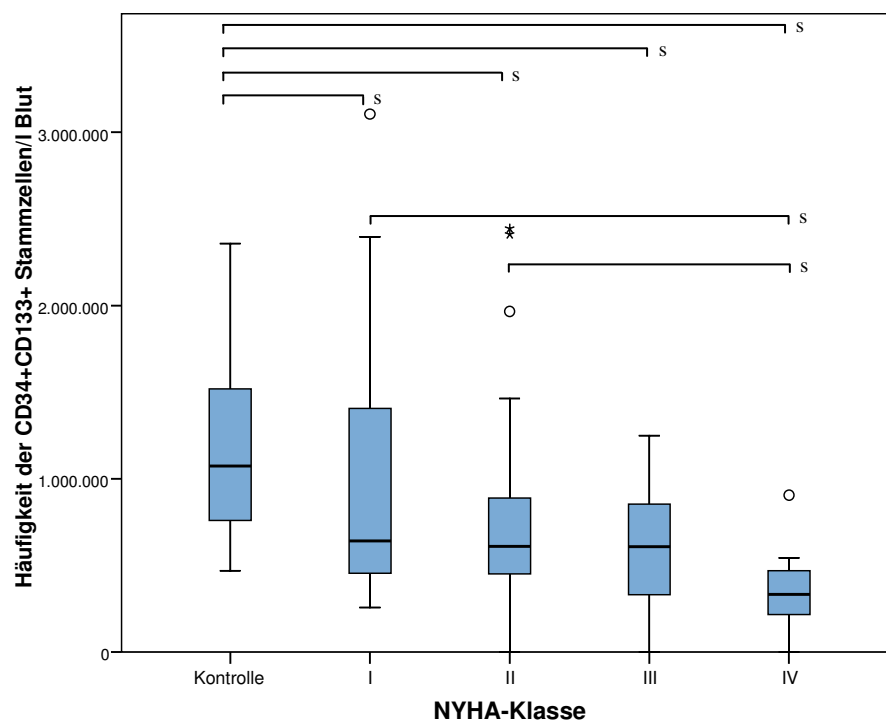


Abbildung 13: Boxplot-Darstellung der Verteilung der peripher zirkulierenden $CD34^+CD133^+$ Stammzellen je Liter Blut sowie Gegenüberstellung der einzelnen NYHA-Gruppen und der Referenzgruppe. Die Kennzeichnung mit ^s erfolgte bei signifikanter Unterscheidung der Stichproben. Die mit ° oder * gekennzeichneten Beobachtungseinheiten sind als Werte mit großem Abstand zur Box („Ausreißer“) zu betrachten.

5.3.3 Betrachtung der zirkulierenden $CD34^+CD133^+$ Stammzellen bei leichter und schwerer Herzinsuffizienz

In Folge der Einteilung der Herzinsuffizienz in die leichte und schwere Form ergaben die statistischen Berechnungen, dass sich die Häufigkeit der $CD34^+CD133^+$ Zellen bei fortgeschrittener Erkrankung ($n = 45$) verringert, mit einer Anzahl von 543.454 (MW: 558.517 ± 329.608) Zellen je Liter Blut, im Vergleich dazu die milde Erkrankungsform ($n = 66$) mit 638.221 (MW: 858.501 ± 632.014) Zellen je Liter Blut (siehe Tabelle 15 und Verweis auf Abbildung 14). Mit Zunahme der Erkrankung ist eine Verminderung der peripher zirkulierenden $CD34^+CD133^+$ Stammzellen erkennbar.

Tabelle 15: Häufigkeitsverteilung der peripher zirkulierenden CD34⁺CD133⁺ Stammzellen je Liter Blut bei leichter und schwerer Herzinsuffizienz.

	<i>Leichte Herzinsuffizienz</i> n = 66	<i>Schwere Herzinsuffizienz</i> n = 45
CD34⁺CD133⁺ Zellen /l Blut		
Mittelwert ± Standartabweichung	858.501 ± 632.014	558.517 ± 329.608
Median	638.221	543.454

Anhand der Einteilung der Herzinsuffizienzpatienten in leicht und schwer Erkrankte, wurde die Abhängigkeit der Häufigkeit der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen in den Patienten- und der Kontrollgruppe von der Schwere der Herzinsuffizienz statistisch geprüft. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für die paarweisen Vergleiche der Kontrollgruppe mit der jeweiligen Patientengruppe und der Patientengruppen untereinander herangezogen. Als Ergebnis der Berechnungen stellte sich eine signifikante Unterscheidung der Anzahl der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen in jedem der Gruppenvergleiche dar. Mit einem p-Wert von $p < 0,001$ konnte die statistische Signifikanz in der Gegenüberstellung des gesunden Probandenkollektivs sowohl mit der Gruppe der leicht Herzinsuffizienz erkrankten, als auch der Gruppe der schwer Erkrankten gesichert werden. Die Kontrollpopulation weist dementsprechend signifikant mehr CD34⁺CD133⁺ Zellen auf, als die an Herzinsuffizienz erkrankten Personen. Bei dem Vergleich der beiden Patientengruppen untereinander zeigte sich, dass mit einem p-Wert von $p = 0,026$ auch hier eine statistische Signifikanz vorliegt und Patienten mit der milden Erkrankungsform über ein höheres Vorkommen an CD34⁺CD133⁺ Stammzellen verfügen, als schwer erkrankte Patienten (siehe Tabelle 16 und Abbildung 14).

Tabelle 16: Ergebnisse des statistischen Vergleichs der Kontrollgruppe mit der leichten und der schweren Form der Herzinsuffizienz, sowie dieser Patientengruppen untereinander bezüglich der Anzahl der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen.

<i>Paarweiser Vergleich im Mann-Whitney-U-Test</i>	<i>Errechneter p-Wert</i>
Kontrolle vs. Leicht	$p < 0,001$
Kontrolle vs. Schwer	$p < 0,001$
Leicht vs. Schwer	$p = 0,026$

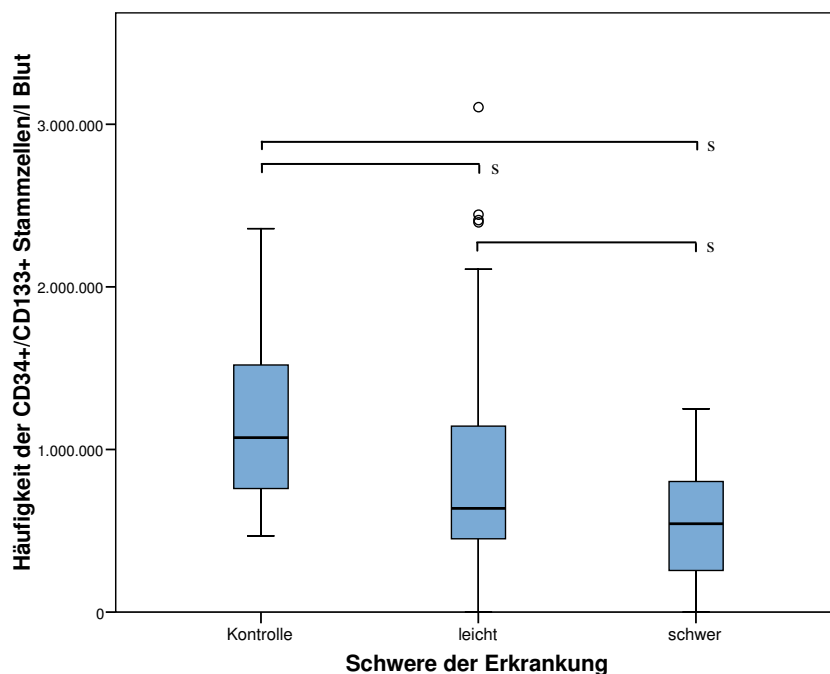


Abbildung 14: Boxplot-Darstellung der Häufigkeiten und Vergleich der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen in der Kontrollgruppe sowie bei leichter und schwerer Herzinsuffizienz. Die Kennzeichnung mit ^s erfolgte bei signifikanter Unterscheidung der Stichproben. Die mit ^o gekennzeichneten Beobachtungseinheiten sind als Werte mit großem Abstand zur Box („Ausreißer“) zu betrachten.

5.4 Betrachtung der peripher zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen

5.4.1 Häufigkeitsverteilung der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen in der Kontroll- und den Patientengruppen

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse sowie der anschließenden Berechnung der Zellanzahl konnte, unter Bezugnahme auf den Lymphozytenwert des jeweiligen Patienten/ Probanden, die Anzahl der $CD34^+CD133^+VEGFR-2^+$ Stammzellen, auch als endotheliale Progenitorzellen (EPC) bezeichnet, je Liter Blut ermittelt werden. Es zeigte sich, dass für die ermittelten Zahlenwerte der EPC keine Normalverteilung vorliegt (siehe Abbildung 15). Aus diesem Grund wird als Angabe der jeweiligen Zellhäufigkeiten der Median als statistisches Maß verwendet. In der Literatur wird zur Beschreibung der Häufigkeitsverteilung der EPC neben dem Median teilweise auch der Mittelwert (MW) angegeben, sodass dieser ebenfalls im Folgenden Erwähnung findet, um damit eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen (siehe Tabelle 17).

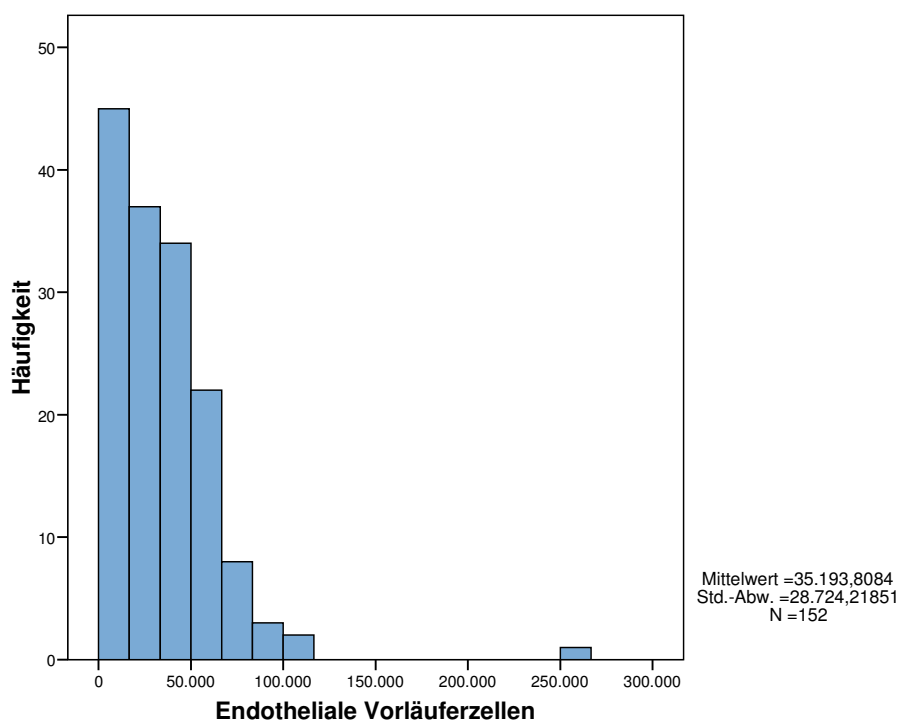


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der Grundgesamtheit aller Messwerte der endothelialen Progenitorzellen in der Histogrammdarstellung.

Tabelle 17: Häufigkeitsverteilung der endothelialen Vorläuferzellen je Liter Blut in der Kontrollgruppe und den Patientengruppen insgesamt und NYHA I bis IV.

	<i>Kontrolle</i>	<i>Patienten</i>	<i>NYHA I</i>	<i>NYHA II</i>	<i>NYHA III</i>	<i>NYHA IV</i>
Anzahl EPC/l Blut						
Mittelwert ± Standartabweichung	44.740 ± 16.687	31.869 ± 31.249	54.474 ± 43.748	31.351 ± 17.231	16.254 ± 14.144	15.945 ± 21.216
Median	42.667	24.759	41.780	28.830	11.250	8.615

Den in Tabelle 17 dargestellten Ergebnissen lässt sich entnehmen, dass der Median und der Mittelwert der EPC des Kontrollkollektivs (Median: 42.667 Zellen/l Blut, MW: 44.740 ± 16.687 Zellen/l Blut) den Median und den Mittelwert des Patientenkollektivs (Median: 24.759 Zellen/l Blut, MW: 31.869 ± 31.249 Zellen/l Blut) übersteigen. Vergleicht man die Zellhäufigkeiten der Kontrollgruppe mit denen der einzelnen NYHA-Klassen so ist festzustellen, dass sich die Zahl der endothelialen Progenitorzellen der NYHA-Klasse I von denen der Kontrolle nur sehr gering unterscheidet, während die Zellzahlen der höheren Schweregrade unterhalb derer der Kontrolle bleiben. Bezogen auf die einzelnen NYHA-Gruppen ist erkennbar, dass mit Zunahme des Schweregrades der Herzinsuffizienz die Größenordnungen der Endothelialen Stammzellen abnehmen. Die Zellzahl je Liter peripheren Blutes liegt in NYHA-Klasse I bei 41.780 (MW: 54.474 ± 43.748) Zellen, in NYHA-Klasse II bei 28.830 (MW: 31.351 ± 17.231) Zellen, in NYHA-Klasse III bei 11.250 (MW: 16.254 ± 14.144) Zellen und in NYHA-Klasse IV bei 8.615 (MW: 15.945 ± 21.216) Zellen.

Bezogen auf die Lymphozyten- bzw. die Leukozytenpopulation der Patienten/Probanden beträgt der Anteil der CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁺ Zellen im Durchschnitt in NYHA-Gruppe I 0,003% bzw. 0,0008%, in NYHA-Gruppe II 0,002% bzw. 0,0005%, in NYHA-Gruppe III 0,001% bzw. 0,0002% und in NYHA-Gruppe IV 0,002% bzw. 0,0002%. Die Kontrollgruppe wies im Mittel einen Anteil der EPC von 0,003% der Lymphozyten und 0,0007% der Leukozyten auf.

Zur Untersuchung einer statistisch signifikanten Unterscheidung zwischen der Anzahl der EPC der Kontrollgruppe und der Anzahl der EPC der einzelnen NYHA-Klassen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet und auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ getestet. Es wurden jeweils paarweise die Kontrollgruppe mit einer NYHA-Gruppe verglichen und somit insgesamt vier Tests durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die Zellanzahl des Kontrollkollektivs signifikant von der Zellhäufigkeit der Patientengruppen NYHA II ($p = 0,001$), NYHA III ($p < 0,001$) und NYHA IV ($p < 0,001$) abwichen. Eine Unterscheidung zwischen der EPC-Zahl der Kontrollgruppe und der NYHA-Klasse I ($p = 0,685$) konnte statistisch signifikant nicht gesichert werden (siehe Tabelle 18). Die Tendenz einer größeren Häufigkeit der $CD34^+CD133^+VEGFR-2^+$ Zellen in NYHA I im Vergleich zur Kontrollgruppe, ist jedoch erkennbar. Es lässt sich abschließend feststellen, dass die Anzahl der peripher zirkulierenden EPC in der Kontrollgruppe die Anzahl der EPC der NYHA-Klassen II, III und IV übersteigt. Im Vergleich zur NYHA-Klasse I zeigt sich jedoch eine verringerte EPC-Zahl der Kontrolle (Verweis auf Abbildung 16).

Tabelle 18: Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung eines Unterschiedes der EPC-Anzahl zwischen der Kontroll- und den NYHA-Gruppen.

<i>Paarweiser Vergleich im Mann-Whitney-U-Test</i>	<i>Berechneter p-Wert</i>
Kontrolle vs. NYHA I	$p = 0,685$
Kontrolle vs. NYHA II	$p = 0,001$
Kontrolle vs. NYHA III	$p < 0,001$
Kontrolle vs. NYHA IV	$p < 0,001$

5.4.2 Abhängigkeit der Häufigkeit der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen vom Ausprägungsgrad der Herzinsuffizienz

Als weitere statistische Analyse schloss sich die Beurteilung der Häufigkeit der endothelialen Progenitorzellen in Abhängigkeit vom Schweregrad der Herzinsuffizienz an. Dazu wurde zu Beginn mit Hilfe des globalen Kruskal-Wallis-Testes untersucht, ob allgemein ein statistisch signifikanter Einfluss der NYHA-Klassen auf die Anzahl der EPC besteht. Als Ergebnis des Kruskal-Wallis-Testes konnte ein p-Wert von $p < 0,001$ ermittelt werden. Somit war es möglich, über weitere statistische Tests zu prüfen, ob eine Abhängigkeit der EPC-Zahl von der Schwere der Herzerkrankung signifikant existiert.

Es wurden in sechs paarweisen Mann-Whitney-U-Tests alle NYHA-Klassen miteinander verglichen, die entsprechenden p-Werte ermittelt und diese anschließend der α -Adjustierung nach Holm unterzogen. Im paarweisen Vergleich der Klassen ergab sich: NYHA I und II $p = 0,001$, NYHA I und III $p < 0,001$, NYHA I und IV $p < 0,001$, NYHA II und III $p < 0,001$ sowie NYHA II und IV $p = 0,003$.

Im Anschluss erfolgte die Ordnung der p-Werte aufsteigend der Größe nach und der Vergleich mit den Signifikanzschranken nach Holm (Verweis auf Tabelle 6). Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass sich die Anzahl der EPC in den vier NYHA-Klassen signifikant voneinander unterscheiden. Es besteht ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der endothelialen Progenitorzellen und dem Schweregrad der Herzinsuffizienz. Dem entsprechend verringert sich mit Zunahme der Herzerkrankung die Anzahl der peripher im Blut zirkulierenden Endothelialen Vorläuferzellen. Zwischen den NYHA-Gruppen III und IV, $p = 0,338$ und Abbruch der α -Adjustierung nach Holm beim Vergleich des letzten (sechsten) p-Wertes, konnte eine statistisch signifikante Abhängigkeit der EPC-Zahl vom Schweregrad der Herzinsuffizienz in dieser Stichprobe nicht gesichert werden (siehe Tabelle 19 und Abbildung 16).

Tabelle 19: Ergebnisse des paarweisen Vergleichs der NYHA-Klassen untereinander zur Untersuchung der Anhängigkeit der EPC-Zahl vom Schweregrad der Herzinsuffizienz.

<i>Paarweiser Vergleich der NYHA-Klassen mittels Mann-Whitney-U-Test</i>	<i>Errechneter p-Wert</i>
NYHA I vs. II	p = 0,001
NYHA I vs. III	p < 0,001
NYHA I vs. IV	p < 0,001
NYHA II vs. III	p < 0,001
NYHA II vs. IV	p = 0,003
NYHA III vs. IV	p = 0,338

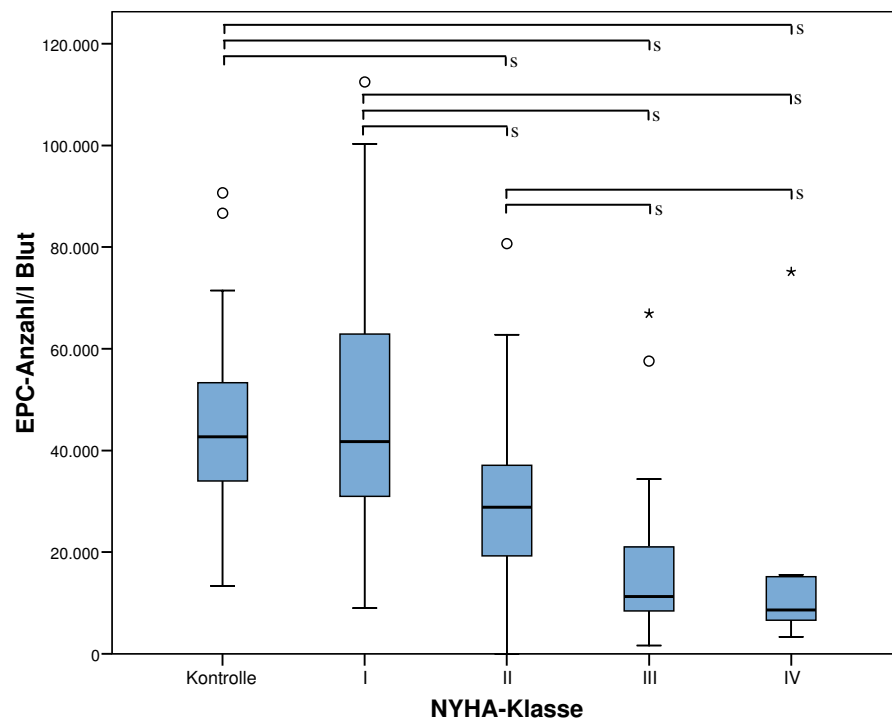


Abbildung 16: Boxplot-Darstellung der Anzahl der peripher zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen je Liter Blut und Gegenüberstellung der einzelnen NYHA-Klassen sowie der Kontrollgruppe. Die Kennzeichnung mit ^s erfolgte bei signifikanter Unterscheidung der Stichproben. Die mit ° oder * gekennzeichneten Beobachtungseinheiten sind als Werte mit großem Abstand zur Box („Ausreißer“) zu betrachten.

5.4.3 Betrachtung der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen bei leichter und schwerer Herzinsuffizienz

Die Einteilung der Herzinsuffizienz erfolgte, neben der NYHA-Klassifikation, auch in die leichte und schwere Form, welche sich jeweils aus den NYHA-Klassen I und II ($n = 66$), sowie den NYHA-Klassen III und IV ($n = 45$) zusammensetzte. Beim Vergleich dieser beiden Patientengruppen zeigt sich, dass die Häufigkeit der Vorläuferzellen im leichten Erkrankungsstadium über dem 3fachen der Häufigkeit der schweren Erkrankungsstufe liegt. Die Anzahl der EPC der leichten Form beträgt 34.977 (MW: 42.224 ± 34.937) Zellen je Liter Blut, während die der schweren Form 11.173 (MW: 16.186 ± 15.705) Zellen je Liter Blut beträgt (siehe Tabelle 20 und Verweis auf Abbildung 17).

Tabelle 20: Häufigkeitsverteilung der EPC je Liter Blut bei schwerer und leichter Form der Herzinsuffizienz.

	<i>Leichte Herzinsuffizienz</i> n = 66	<i>Schwere Herzinsuffizienz</i> n = 45
Anzahl EPC/l Blut		
Mittelwert \pm Standardabweichung	42.224 ± 34.937	16.186 ± 15.706
Median	34.977	11.173

Bezogen auf die Einordnung der Herzinsuffizienzpatienten in die leichte und schwere Form wurde die Abhängigkeit der Zellzahl vom Ausprägungsgrad der Erkrankung untersucht. Zu Beginn wurden die leichte und schwere Krankheitsgruppe paarweise mit der Kontrollgruppe verglichen. Im Anschluss daran erfolgte die Gegenüberstellung der zwei Patientengruppen miteinander (siehe Tabelle 21 und Abbildung 17).

Eine statistisch signifikante Unterscheidung der Größenordnungen der EPC-Zahl wurde, mit einem p-Wert von $p < 0,001$, für den Vergleich der schweren Form der Herzinsuffizienz mit der Kontrollgruppe festgestellt. Für den Vergleich der leichten Form mit der Kontrollgruppe konnte die statistische Signifikanz mit einem $p = 0,069$ nicht gesichert werden. Bei der Betrachtung der beiden Erkrankungsstadien zeigte sich, dass die Anzahl der $CD34^+CD133^+VEGFR-2^+$ Stammzellen signifikant ($p < 0,001$) durch deren Ausprägungsgrad bestimmt wird. Es besteht demnach auch hier ein Zusammenhang

zwischen der Schwere der Herzinsuffizienz und der Häufigkeit der Endothelialen Vorläuferzellen im Sinne einer Verminderung der Zellzahl bei Zunahme der Erkrankung.

Tabelle 21: Statistische Ergebnisse der Häufigkeit der endothelialen Progenitorzellen bei der Kontrolle sowie leichter und schwerer Herzinsuffizienz.

<i>Paarweiser Vergleich im Mann-Whitney-U-Test</i>	<i>Errechneter p-Wert</i>
Kontrolle vs. Leicht	$p = 0,069$
Kontrolle vs. Schwer	$p < 0,001$
Leicht vs. Schwer	$p < 0,001$

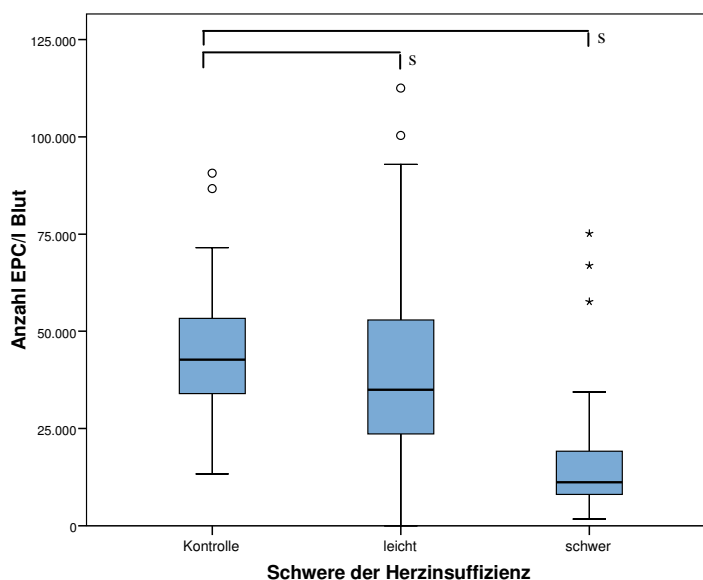


Abbildung 17: Boxplot-Darstellung der Anzahl der endothelialen Progenitorzellen je Liter Blut in Abhängigkeit von der Schwere der Herzinsuffizienz sowie Gegenüberstellung der einzelnen Patientengruppen und der Kontrollgruppe. Die Kennzeichnung mit ^s erfolgte bei signifikanter Unterscheidung der Stichproben. Die mit ° oder * gekennzeichneten Beobachtungseinheiten sind als Werte mit großem Abstand zur Box („Ausreißer“) zu betrachten.

5.4.4 Betrachtung des Einflusses klinischer und laborchemischer Parameter auf die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen

Die klinischen Parameter BMI, dilatative Kardiomyopathie, arterielle Hypertonie, Koronare Herzerkrankung, Diabetes mellitus, Lebensalter, Rauchen und NYHA-Klassifikation sowie der laborchemische Parameter BNP, welche bereits unter Punkt 4.3.9 Erwähnung fanden, wurden ebenfalls geprüft, um einen möglichen Einfluss auf die Anzahl der peripher zirkulierenden EPC zu ermitteln. Diese Untersuchung erfolgte mit einer multiplen linearen Regressionsanalyse. Im Rahmen der statistischen Berechnung zeigte sich, dass neben dem Schweregrad der Herzinsuffizienz das Alter einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der EPC ausübt. Die Bestimmtheitsmaße R-Quadrat und korrigiertes R-Quadrat lagen bei 0,22 und 0,2 und ließen damit die Aussage zu, dass der Schweregrad der Herzinsuffizienz und das Alter des Patienten die Anzahl der peripher zirkulierenden EPCs zu etwa 20% beeinflussen (siehe Tabelle 22). Für die übrigen klinischen Parameter sowie den BNP-Wert konnte in der vorliegenden Stichprobe kein statistisch signifikanter Einfluss auf die Zellzahl gesichert werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass der -bereits unter Punkt 5.4.2 geschilderte- Einfluss des Schweregrades der Herzerkrankung auf die EPC-Zahl mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse bestätigt werden konnte.

Tabelle 22: Modellzusammenfassung der linearen Regressionsanalyse mit den Bestimmtheitsmaßen R-Quadrat und korrigiertes R-Quadrat (modifizierter SPSS-Auszug).

Modell	R	R-Quadrat	Korrigiertes R-Quadrat
1 Einflußvariablen : DCM, NYHA-Klasse, Rauchen, BMI, DiabMel, KHK, BNP, Alter, Hypertonie	0,509	0,260	0,173
2 Einflußvariablen : DCM, NYHA-Klasse, Rauchen, DiabMel, KHK, BNP, Alter, Hypertonie	0,509	0,259	0,183
3 Einflußvariablen : DCM, NYHA-Klasse, Rauchen, DiabMel, KHK, Alter, Hypertonie	0,508	0,258	0,192
4 Einflußvariablen : DCM, NYHA-Klasse, DiabMel, KHK, Alter, Hypertonie	0,507	0,257	0,201
5 Einflußvariablen : DCM, NYHA-Klasse, KHK, Alter, Hypertonie	0,504	0,254	0,208
6 Einflußvariablen : DCM, NYHA-Klasse, KHK, Alter	0,500	0,250	0,213
7 Einflußvariablen : DCM, NYHA-Klasse, Alter	0,482	0,232	0,205
8 Einflußvariablen : NYHA-Klasse, Alter	0,465	0,216	0,197

5.5 Gegenüberstellung der einzelnen Stammzellpopulationen

5.5.1 Vergleich der CD34⁺ und der CD34⁺CD133⁺ Stammzellpopulationen miteinander

Im Durchschnitt wies die Population der CD34⁺ Stammzellen aller herzinsuffizienten Patienten $1.628.137 \pm 1.130.967$ Zellen je Liter Blut (1.628 ± 1.130 Zellen/ml Blut) auf. Dies entspricht einem Anteil von 0,11% CD34⁺ Zellen an der Lymphozyten-population und 0,023% der CD34⁺ Zellen an der Leukozytenpopulation. Bei der parallelen Betrachtung der CD34⁺CD133⁺ Stammzellpopulation bei Herzinsuffizienten beträgt die Größenordnung im Mittel 736.886 ± 548.980 peripher zirkulierende Zellen je Liter Blut (737 ± 549 Zellen/ml Blut). Bezogen auf die Population der Lymphozyten und Leukozyten ergeben sich hier Anteile der CD34⁺CD133⁺ Zellen von 0,048% bzw. von 0,01%. Aus diesen Ergebnissen resultiert, dass 45,3% aller CD34⁺ Zellen bei Herzinsuffizienzpatienten gleichzeitig auch für CD133 positiv sind und die eigenständige Population der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen bilden. Für die einzelnen NYHA-Klassen sind die Mittelwerte der genannten Zellpopulationen sowie die Anteile der CD34⁺CD133⁺ Zellen an den CD34⁺ Stammzellen grafisch in Abbildung 18 dargestellt.

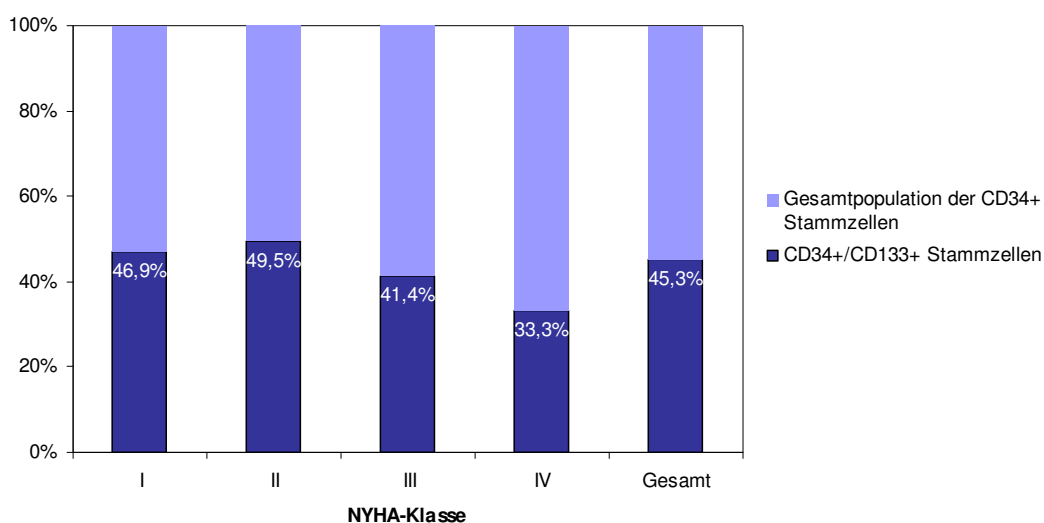


Abbildung 18: Grafische Darstellung der prozentualen Anteile der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen an der Grundgesamtheit der CD34⁺ Stammzellen in den NYHA-Klassen I-IV und bei allen herzinsuffizienten Patienten.

5.5.2 Vergleich der CD34⁺ Stammzellpopulationen mit der Population der endothelialen Progenitorzellen

Im Rahmen der statistischen Untersuchungen erfolgte ebenfalls die Gegenüberstellung der CD34⁺ Stammzellpopulation mit der Population der CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁺ Zellen (EPC). Die Häufigkeit der CD34⁺ Zellen lag im Patientenkollektiv, wie bereits beschrieben, im Mittel bei $1.628.137 \pm 1.130.967$ Zellen je Liter Blut (1.628 ± 1.130 Zellen/ml Blut), mit einem Lymphozyten- und einem Leukozytenanteil von 0,11% bzw. 0,023%. Der Durchschnitt der EPC bei allen herzinsuffizienten Patienten konnte auf 31.869 ± 31.249 peripher zirkulierende Zellen je Liter Blut ($31,9 \pm 31,3$ Zellen/ml Blut) beziffert werden. Dies entspricht einem durchschnittlichen Anteil von 0,002% an der Lymphozytenpopulation sowie von 0,0005% an der gesamten Leukozytenpopulation. Bei der Betrachtung des Mengenverhältnisses der beiden genannten Zellgruppen zeigte sich, dass 2,0% aller CD34 positiven Stammzellen zusätzlich die Marker CD133 und VEGFR-2 exprimieren und somit dreifach positiv sind. Der Anteil der EPC an der gesamten Stammzellpopulation ist, mit etwa einem Fünzigstel, vergleichsweise gering. In Abbildung 19 sind die Häufigkeiten der beiden Stammzellgruppen für jede NYHA-Klasse einzeln aufgeführt, sowie die jeweilige Verteilung der EPC in der Gruppe der CD34⁺ Zellen.

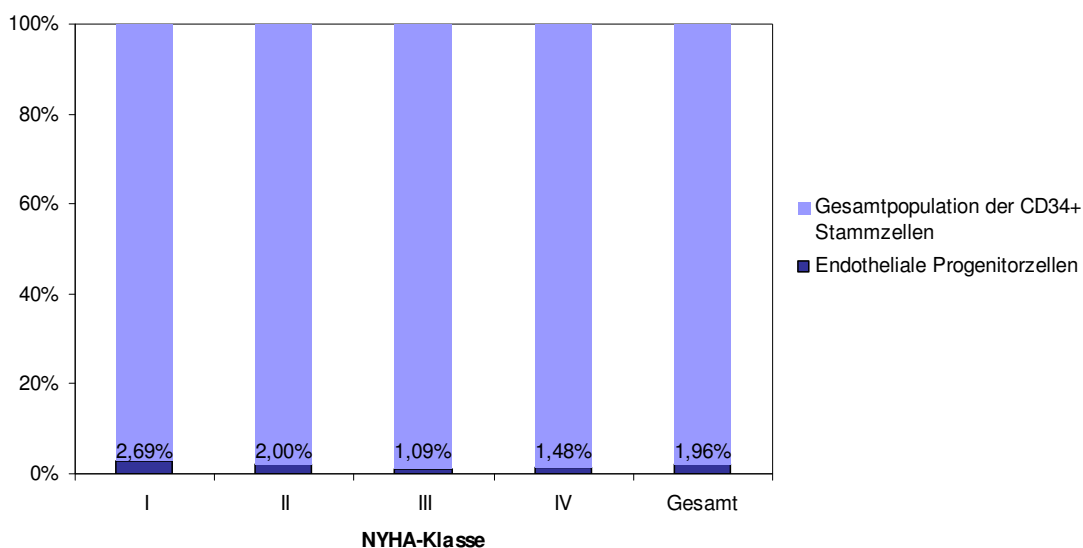


Abbildung 19: Grafische Darstellung der prozentualen Anteile der endothelialen Progenitorzellen an der Gesamtpopulation der CD34⁺ Stammzellen in den NYHA-Klassen I-IV und bei allen herzerkrankten Patienten.

5.5.3 Vergleich der CD34⁺CD133⁺ Stammzellpopulationen mit der Population der endothelialen Progenitorzellen

Wie bereits in den vorangegangenen Gliederungspunkten erwähnt, beträgt die Häufigkeit der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen in der Grundgesamtheit der Patienten im Mittel 736.886 ± 548.980 Zellen je Liter Blut (737 ± 549 Zellen/ml Blut) mit einem Anteil von 0,048% der CD34⁺CD133⁺ Zellen an der Lymphozytenpopulation und 0,01% an der Leukozyten-population. Ebenso besitzt die Population der EPC im Kollektiv der herzinsuffizienten Patienten 31.869 ± 31.249 peripher zirkulierende Zellen je Liter Blut ($31,9 \pm 31,3$ Zellen/ml Blut) und dementsprechend einen Anteil von 0,002% der Lymphozyten sowie einen Anteil von 0,0005% der gesamten Leukozyten. Bei der Gegenüberstellung der einzelnen Zellpopulationen zeigte sich, dass durchschnittlich 4,3% der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen herzinsuffizienter Patienten den Oberflächenmarker VEGFR-2 exprimieren. Damit beträgt der Anteil, der für alle drei genannten Marker positiven Zellen an der Grundgesamtheit der CD34⁺CD133⁺ Zellen, etwa ein Zwanzigstel. Die Abbildung 20 veranschaulicht die Häufigkeiten der beiden genannten Zellpopulationen und die Mengenverteilung der EPC in der Gesamtheit der CD34⁺CD133⁺ Zellen.

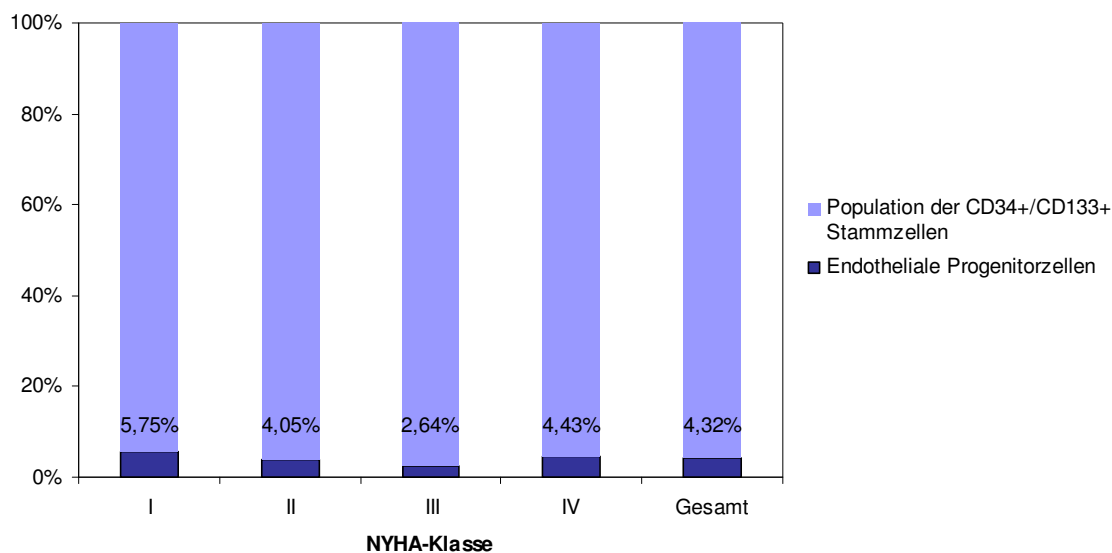


Abbildung 20: Darstellung der prozentualen Anteile der Endothelialen Vorläuferzellen an der Gesamtpopulation der CD34⁺CD133⁺ Stammzellen in den NYHA-Klassen I-IV und in der Gesamtheit der Herzinsuffizienzpatienten.

6 Diskussion

6.1 Variabilität der Anzahl endothelialer Vorläuferzellen bei Herzinsuffizienzpatienten

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Herzinsuffizienz männlicher Patienten und der Anzahl der peripher im Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen besteht. Dazu wurden Blutproben von insgesamt 111 erkrankten männlichen Patienten und 41 gesunden männlichen Probanden, als Kontrollgruppe ohne kardiovaskuläres Risiko, durchflusszytometrisch analysiert und die jeweilige Anzahl der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Stammzellen bestimmt. Es zeigt sich, dass die Kontrollgruppe deutlich höhere Werte endothelialer Stammzellen aufweist, als die Gesamtheit aller Herzinsuffizienzpatienten. Bei der Betrachtung der einzelnen Herzinsuffizienzschwergrade, eingeteilt entsprechend der NYHA-Klassifikation, ist festzustellen, dass die NYHA-Klassen sich bezüglich ihres Vorkommens an zirkulierenden EPC signifikant voneinander unterscheiden. Das leichteste Erkrankungsstadium NYHA-Klasse I verfügt dabei über die höchsten EPC-Zahlen. Mit Zunahme der Schwere der Herzerkrankung verringert sich die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen in den einzelnen Klassen schrittweise. Das geringste Niveau erreicht die EPC-Zahl im schwersten Erkrankungsstadium NYHA IV. Es besteht demnach eine umgekehrte Beziehung zwischen der Schwere der Herzinsuffizienz und der Anzahl der im Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen. Bei den schweren Formen der Herzinsuffizienz der Klassen III und IV, kann eine Unterscheidung der EPC bezüglich ihrer Anzahl jedoch nicht statistisch signifikant gesichert werden. Die parallel dazu bestimmten endothelialen Vorläuferzellen der gesunden männlichen Kontrollgruppe weisen, verglichen mit den NYHA-Klassen II, III und IV, signifikant höhere EPC-Zahlen auf.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Verteilung der endothelialen Stammzellen innerhalb der verschiedenen Erkrankungsstadien der Herzinsuffizienz stimmen mit den publizierten Resultaten der Arbeitsgruppe um Valgimigli aus dem Jahr 2004 überein. In der Studie von Valgimigli erfolgte bei 41 herzinsuffizienten

Patienten die durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl der peripheren EPC sowie die Analyse der Zellverteilung anhand der NYHA-Klassifikation. Das Resultat dieser Untersuchungen ergab ebenfalls, dass mit der Zunahme der Herzerkrankung eine Abnahme der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen einhergeht (Valgimigli et al. 2004). Eine statistisch signifikante Unterscheidung der EPC-Anzahl in den NYHA-Klassen III und IV konnte auch von Valgimigli et al nicht gesichert werden. Möglicherweise waren die Stichprobengrößen der NYHA-Klasse IV sowohl bei Valgimigli, als auch bei der hier durchgeführten Studie zu gering, um sie signifikant von der Klasse III abgrenzen zu können. Eine abfallende Tendenz der Zellzahl von Klasse III auf IV ist dennoch erkennbar, was vermuten lässt, dass die endothelialen Progenitorzellen in der Gruppe IV am stärksten beeinträchtigt sind.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Ergebnisse von Valgimigli et al durch die Resultate der vorliegenden Arbeit, welche über einen größeren Stichprobenumfang verfügt und sich auf ein ausschließlich männliches Patientenkollektiv beschränkt, bestätigt wurden. Die Verteilung der EPC in den NYHA-Klassen der rein männlichen Patientenpopulation dieser Studie unterscheidet sich nicht von der Verteilung der EPC in der Stichprobe von Valgimigli, die sowohl Frauen als auch Männer einschloss. Die von Strehlow et al 2003 und Iwakura et al 2003 veröffentlichten Publikationen berichteten von einer östrogenvermittelten Steigerung der Reendothelialisierung mit Reduktion der Ausbildung einer Neointima nach Gefäßschädigung. Dies wurde vermittelt über eine vermehrte Mobilisierung der EPC aus dem Knochenmark. Dazu wurden in beiden Versuchsabläufen Experimente an Mäusen durchgeführt. Strehlow et al untersuchten zusätzlich das Blut von 15 Frauen die sich, im Rahmen einer geplanten In-vitro-Fertilisation, einer ovariellen Hyperstimulation unterzogen und somit erhöhte Östrogen Plasmaspiegel aufwiesen. Diesen Patientinnen wurde vor und sechs bis zehn Tage nach Beginn der Follikel-stimulierenden Hormontherapie Blut entnommen, aus welchem die Anzahl der peripher zirkulierenden endothelialen Stammzellen durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der zirkulierenden EPC nach Hormonstimulation auf $463\% \pm 102\%$ des Ausgangswertes vor Beginn der Hormontherapie anstieg (Strehlow et al. 2003). Dementsprechend liegen die EPC-Werte, wenn sich der Östrogenspiegel im physiologischen Bereich befindet und somit die Mobilisation der endothelialen Stammzellen nicht gesteigert ist, deutlich niedriger. Es wäre aus diesem Grund denkbar, dass die herzinsuffizienten Patientinnen, wie sie von Valgimigli in seine Studie

eingeschlossen wurden, über einen physiologischen oder einen postmenopausal erniedrigten Östrogenspiegel (Zeleniuch-Jacquotte et al. 2001, Davidson et al. 2000, Grodstein et al. 1997) -der aufgrund der Alterstruktur der Patientengruppe von Valgimigli mit einem durchschnittlichen Alter von 67 ± 11 Jahren nicht unwahrscheinlich erscheint- verfügen. Die östrogenbedingte Freisetzung der endothelialen Stammzellen in die periphere Blutbahn könnte in diesen Fällen von geringerem Ausmaß sein, als von Strehlow et al und Iwakura et al beschrieben. Die Experimente an Mäusen belegten, dass mit Östrogen behandelte Tiere nach operativer Induktion eines Gefäßtraumas an den Karotiden der Tiere eine gesteigerte Mobilisation von endothelialen Vorläuferzellen, in diesen Fällen Sca-1/Flk-1 positive (Iwakura et al. 2003) oder Sca-1/VEGF-R2 positive Zellen (Strehlow et al. 2003), aus dem Knochenmark einsetzte. Allerdings sind die am Tiermodell durchgeführten experimentellen Untersuchungen nicht komplett auf den Menschen übertragbar. Eine aktuelle Studie, bei der Untersuchungen am Menschen vorgenommen wurden, berichtet über eine gesteigerte Ausbildung von EPC-Kolonien und eine verbesserte Migration der endothelialen Vorläuferzellen bei Frauen, verglichen mit männlichen Probanden (Hoetzer et al. 2007). Bei den in dieser Studie geprüften Faktoren handelt es sich um funktionelle Eigenschaften der EPC. Eine quantitative Unterscheidung der peripher zirkulierenden EPC wurde bei den männlichen und weiblichen Probanden nicht vorgenommen, sodass diesbezüglich keine Aussage getroffen werden kann. Gegebenenfalls beschränken sich die geschlechtsspezifischen Differenzen der EPC auf deren funktionelle Zelleigenschaften. Von der Herzinsuffizienz ist bekannt, dass multiple Regulationsmechanismen und neurohumorale Prozesse aktiviert werden (Genth-Zotz et al. 2004), welche die EPC in ihrer Menge und Funktion beeinflussen können. Inwieweit bei diesen Mechanismen geschlechtsspezifische Unterschiede vorliegen, die einen Einfluss auf die Anzahl der EPC ausüben können, muss in weiterfolgenden Studien erforscht werden. Der Vorteil der hier vorliegenden Arbeit besteht darin, dass eine rein männliche Stichprobe untersucht wurde und daher ein hormoneller Einfluss der EPC durch Östrogen ausgeschlossen werden kann. Im Vergleich der Ergebnisse von Valgimigli et al mit denen der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass trotz eines Anteils von etwa 20% weiblicher Probanden in der Stichprobe von Valgimigli die Verteilung der EPC in den unterschiedlichen Erkrankungsstadien der Herzinsuffizienz in beiden Arbeiten nahezu identisch ist. Dies spricht dafür, dass das Östrogen die EPC-Verteilung im Rahmen der Herzinsuffizienz wahrscheinlich nur sehr gering beeinflusst. Dennoch könnte der Frauenanteil in der Patientenpopulation von Valgimigli dafür verantwortlich sein, dass

diese Arbeitsgruppe im Mittel eine höhere Anzahl von EPC ermittelte, als die vorliegende Arbeit. Dies lässt vermuten, dass aufgrund des Östrogeneinflusses die Anzahl der peripher zirkulierenden EPC gesteigert wird, die Verteilung dieser Zellen in den einzelnen Erkrankungsstadien sich jedoch nicht verändert.

Eine weitere Erklärung für die erhöhten Zellzahlen bei Valgimigli könnte in den voneinander abweichenden Methoden zur Präparation der endothelialen Vorläuferzellen liegen. Denn die angewendeten methodischen Verfahren zur Extraktion und zur durchflusszytometrischen Detektierung der EPC können wesentlich zur Beeinflussung der EPC-Anzahl beitragen (Khan et al. 2005). Bislang kommen zur Untersuchung der endothelialen Stammzellen eine Reihe verschiedener Methoden zum Einsatz (Shaffer et al. 2006). Es ist denkbar, dass dies zum einen für die größere Anzahl an EPC, welche von Valgimigli et al erzielt wurden, verantwortlich sein kann. Zum anderen zeichnete sich bei den in der vorliegenden Studie vorgenommenen durchflusszytometrischen Messungen der einzelnen Proben eine große interindividuelle Schwankungsbreite der ermittelten Zellzahlen ab. Dies macht sich zum Teil in den hohen Werten der Standardabweichung des Mittelwertes, wie sie auch bei Valgimigli et al zu finden sind, bemerkbar. Diese Schwankungen könnten ebenfalls dazu geführt haben, dass in dieser Studie insgesamt geringere Zellzahlen detektiert wurden.

Im vergangenen Jahr wurde von der israelischen Forschungsgruppe um Michowitz die Quantität der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen bei Herzinsuffizienzpatienten untersucht und der Frage nachgegangen, inwieweit diese EPC-Anzahl als prädiktiver Wert in Bezug auf das klinische Outcome, einschließlich herzinsuffizienzbedingter Hospitalisierung und Mortalität, dienen könnte. Dazu wurden mononucleäre Zellen des Blutes isoliert, für sieben Tage kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch quantifiziert. Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass sich der EPC-Spiegel eines Patienten als Vorhersagewert für einen herzinsuffizienzbedingten Krankenhausaufenthalt eignet. Allerdings zeigte sich, dass die Anzahl der endothelialen Stammzellen statistisch signifikant mit der NYHA-Klasse korrelierte. Im Gegensatz zu den ermittelten Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wiesen bei Michowitz et al Patienten mit einer schweren Herzinsuffizienz mehr EPC-CFUs (EPC-Colony forming units) auf, als Patienten mit einer leichteren Form der Erkrankung (Michowitz et al. 2007). Bei der Kultivierung der endothelialen Stammzellen im Rahmen der Studie von Michowitz et al befanden sich die

Zellen für sieben Tage in einem Nährmedium. Die EPC waren in diesem Zeitraum nicht mehr den Einflüssen der verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren, die sich im Serum des Patienten befanden ausgesetzt. Somit waren die kultivierten Zellen nicht mehr den, zum Teil noch nicht vollständig verstandenen, Regulations- und Mobilisationsmechanismen der endothelialen Vorläuferzellen unterworfen. Es wäre beispielsweise denkbar, dass die multiplen Einflussfaktoren auf die EPC unterschiedlich nachhaltig auf diese Zellen wirken und somit möglicherweise supprimierende Einflüsse, wie z.B. TNF- α (Valgimigli et al. 2004), auf die Anzahl der endothelialen Vorkäufzellen von geringerer Wirkdauer sind, als stimulierende Substanzen. Weiterhin setzte sich das Patientenkollektiv bei den Untersuchungen von Michowitz et al aus Erkrankten der NYHA-Klassen II bis IV mit einem nur geringen Anteil von schwer herzinsuffizienten Patienten (NYHA IV n = 8) zusammen. Die Aussagekraft der Studie zur Patientengruppe im niedrigen Erkrankungsstadium (NYHA I) bzw. im sehr hohen Stadium (NYHA IV) könnte deshalb möglicherweise eingeschränkt sein. Vermutlich beeinflusst die durchflusszytometrische Analyse, welche die momentane Anzahl der endothelialen Stammzellen -aus ihrem Mikromilieu im Serum heraus- wiedergibt, die Zellen geringer, als die Methode der Kultivierung, bei der die EPC erst nach ihrem Wachstum und ihrer Proliferation beurteilt werden. Es ist unsicher, in welcher Art und Weise die Anreicherung der Zellen in Kultur die Anzahl verändert, weshalb eine präzise Quantifizierung erschwert sein kann (Khan et al. 2005). Demzufolge könnten die gegensätzlichen Ergebnisse von Michowitz et al und der hier vorliegenden Arbeit auf die Anwendung zweier verschiedener Methoden zur Quantifizierung der endothelialen Vorläuferzellen zurückzuführen sein.

Den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ist es möglich, die unterschiedlichen Schweregrade der Herzinsuffizienz anhand der peripher im Blut zirkulierenden EPC zu differenzieren. Die EPC in den einzelnen NYHA-Klassen, ausgenommen die Gruppen III und IV, verringern sich schrittweise mit deutlicher Signifikanz. Somit wäre es vorstellbar, bei Patienten die sich klinisch nur schlecht eindeutig einem Schweregrad der Herzinsuffizienz zuordnen lassen, ergänzend die Anzahl der EPC zu bestimmen, um eine Einstufung in die entsprechende NYHA-Klasse vorzunehmen. Daraus könnten sich wiederum therapeutische Konsequenzen ableiten. Für die Diagnostik der Herzinsuffizienz in der Zukunft, aber auch im Rahmen von Verlaufsbeobachtungen zur Feststellung einer möglichen Verschlechterung der Erkrankung, könnte die Bestimmung der peripheren EPC eine ergänzende, nicht invasive Methode darstellen. Allerdings ist eine Unterscheidung der

Klassen III und IV nach Datenlage dieser Studie nicht möglich. Kritisch muss dazu angemerkt werden, dass der Stichprobenumfang der Klasse IV recht gering ist und aus diesem Grund möglicherweise die Aussage dieses Ergebnisses beeinträchtigt werden kann. Zur genaueren Beurteilung des Zellvorkommens in den Klassen III und IV sind weitere Studien erforderlich. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, anhand der ermittelten Zellanzahlen eine Differenzierung zwischen erkrankten und gesunden Personen vorzunehmen und auf diese Weise Patienten mit einer Herzinsuffizienz zu selektieren. Eine exakte Unterscheidung von Gesunden und Patienten der NYHA-Klasse I kann jedoch, basierend auf den vorliegenden Daten, nicht eindeutig erfolgen. Zusammenfassend scheint die Bestimmung der EPC-Anzahl geeignet, um eine Aussage bezüglich der einzelnen Schweregrade der Herzinsuffizienz zu treffen.

Im Gliederungspunkt 6.4 werden die möglichen Ursachen für die quantitative Verteilung der endothelialen Stammzellen bei der Herzinsuffizienz diskutiert.

6.2 Variabilität der Anzahl der CD34 positiven Stammzellen bei Herzinsuffizienzpatienten

In der vorliegenden Arbeit erfolgte ferner die Untersuchung der quantitativen Verteilung der CD34⁺ Stammzellen bei Gesunden und Herzinsuffizienzpatienten. Dabei kann statistisch signifikant festgestellt werden, dass gesunde Probanden über eine höhere Anzahl an CD34⁺ Stammzellen verfügen, als an Herzinsuffizienz leidende Patienten. Bei dem Vergleich der einzelnen NYHA-Klassen miteinander zeigten sich keine Differenzen bezüglich der Anzahl der CD34⁺ Zellen. Es lässt sich jedoch mit Zunahme der Erkrankungsschwere eine abfallende Tendenz der Konzentration peripher zirkulierender CD34⁺ Stammzellen erkennen.

Die CD34⁺ Zellen sind als hämatopoietische Stamm- bzw. Vorläuferzellen definiert, können in neu ausgebildete Blutgefäße integriert werden und besitzen die Fähigkeit, die Neovaskularisation beim Menschen zu verbessern (Kocher et al. 2001). Der SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) ist bei der Differenzierung der CD34⁺ Zellen zu Endothelzellen wesentlich involviert (Stellos et al. 2008). Die CD34⁺ Zellen sorgen für die Aufrechterhaltung der Integrität des Gefäßendothels (Asahara et al. 1997, Takahashi et al. 1999). Die Regeneration verschiedener Organe -darunter das Herz- ist möglich, da Vorläuferzellen als Reaktion auf eine Gewebsschädigung aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert und am Ort der Destruktion angereichert werden (Ratajczak et al. 2006). Bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt besitzen die CD34⁺ Zellen die Fähigkeit in Endothelzellen zu differenzieren und daraus resultierend zur funktionellen Verbesserung und zur Reduktion der Infarktgröße beizutragen (Abbott et al. 2004, Numaguchi et al. 2006). Von den CD34⁺ Zellen ist bekannt, dass sie eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen sezernieren. Über diese Mediatoren ist es den CD34 positiven Zellen möglich, zur Regulation der Hämatopoiese beizutragen (Majka et al. 2001). Kultivierte CD34 positive Zellen, welche aus dem Nabelschnurblut isoliert wurden, sind in der Lage endotheliale Zellen zu generieren (Yoo et al. 2003). Kürzlich wurde eine Arbeit veröffentlicht die beschreibt, dass nach koronarer Implantation von Metallgitterstents eine vermehrte Rekrutierung von CD34⁺ Stammzellen, welche möglicherweise weiter differenzieren in Endothelzellen oder glatte Muskelzellen, zu beobachten ist (Inoue et al. 2007).

Die Arbeitsgruppe um Valgimigli untersuchte 2004, neben den CD34⁺/CD133⁺/VEGF-R2⁺ Vorläuferzellen, die Verteilung der CD34 positiven Stammzellen in den NYHA-Klassen I bis IV. Eine schrittweise Reduktion des Vorkommens der CD34⁺ Zellen mit Steigerung des Schweregrades der Herzinsuffizienz wird auch in dieser Veröffentlichung belegt (Valgimigli et al. 2004). Die Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz verfügen demnach über deutlich weniger CD34 positive Stammzellen, als Patienten mit einer geringer ausgeprägten Form der Herzerkrankung. Eine japanische Forschungsgruppe veröffentlichte kürzlich ebenfalls eine Untersuchung zur Verteilung der CD34 positiven Stammzellen bei Patienten mit leichter und schwerer Herzinsuffizienz. Die ermittelten Daten legen dar, dass Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz über deutlich weniger CD34 positive Zellen verfügen, als Patienten mit der leichten Form der Erkrankung. Die Zellzahl der gesunden Kontrollgruppe übersteigt die der schwer Erkrankten, liegt jedoch unterhalb der milden Form (Nonaka-Sarukawa et al. 2007). Verglichen mit den erzielten Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte Nonaka-Sarukawa, über eine Tendenz hinaus, signifikant nachweisen, dass sich die Anzahl der CD34⁺ Stammzellen mit Zunahme des Herzinsuffizienzschweregrades reduziert. Im Unterschied zur Arbeit von Nonaka-Sarukawa liegt die Konzentration der CD34⁺ Zellen der Kontrollgruppe in der hier angefertigten Arbeit statistisch signifikant höher, als bei erkrankten Personen. Bei Nonaka-Sarukawa et al weist dagegen die Gruppe der Erkrankten mit milder Herzinsuffizienz eine größere Anzahl CD34⁺ Zellen auf, als die gesunde Kontrollpopulation. Möglicherweise liegt die Ursache dieser Differenz in der unterschiedlichen Auswahl der in die Studien eingeschlossenen Patienten und Probanden. Zum einen untersuchten Nonaka-Sarukawa et al im Gegensatz zur vorliegenden Studie altersentsprechende Kontrollprobanden. Es ist bekannt, dass mit höherem Lebensalter das Überleben, die Migrationsfähigkeit und die Proliferation von Vorläuferzellen abnehmen (Heiss et al. 2005). Zum anderen schlossen Nonaka-Sarukawa et al Patienten mit akut exazerbierter Herzinsuffizienz in ihre Studie ein, während in der vorliegenden Arbeit die Zellen von Personen mit chronischer Herzinsuffizienz untersucht wurden. In diesem Zusammenhang wäre denkbar, dass aufgrund der akuten Verschlechterung der Herzerkrankung, einhergehend mit Reduktion der kardialen Pumpfunktion und daraus resultierendem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf des Organismus und dessen Bereitstellung (Hermann und Hasenfuss 2004), im Myokard eine Hypoxie ausgelöst wird. Es wurde nachgewiesen, dass bei erniedrigtem Sauerstoffangebot im Myokard reaktiv eine gesteigerte Mobilisation von CD34⁺ Vorläuferzellen einsetzt (Shintani et al. 2001). Auf diese Weise wäre die erhöhte

Zellzahl der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vorstellbar. Darüber hinaus lässt sich im Rahmen einer akuten Exazerbation der Herzinsuffizienz vermuten, dass eine Vielzahl von Mediatoren freigesetzt wird, welche eine Beeinflussung der CD34⁺ Zellen zur Folge haben können. Somit könnte nachvollziehbar sein, dass die unterschiedliche Zusammensetzung der Kontrollgruppe und der Patientengruppen in der Studie von Nonaka-Sarukawa et al und der hier vorliegenden Arbeit verantwortlich ist für die abweichenden Ergebnisse bezüglich der Kontrollpopulationen beider Arbeiten.

Auch das Lebensalter der Patienten bzw. Probanden übt einen Einfluss auf das Vorkommen der CD34⁺ Stammzellen aus. So konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass jüngere Probanden über eine größere Anzahl an CD34⁺ Zellen verfügen, als ältere Menschen, unabhängig davon ob diese gesund waren oder an einer vaskulären Erkrankung litten (Shaffer et al. 2006). Da in der vorliegenden Arbeit die Kontrollgruppe im Mittel ein Alter von 32 ± 8 Jahren besitzt, während in der Patientenpopulation das mittlere Lebensalter 60 ± 13 Jahre beträgt, kann durchaus vermutet werden, dass auch aufgrund dieser Stichprobenzusammensetzung die Kontrolle, im Vergleich zur Patientengruppe, ein signifikant höheres Vorkommen von CD34⁺ Zellen aufweist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, dass sich die Anzahl der CD34⁺ Stammzellen tendenziell mit Zunahme der Herzinsuffizienz reduziert. Statistisch signifikante Daten liegen diesbezüglich jedoch nicht vor. In diesem Zusammenhang erscheint daher die Quantifizierung der peripher zirkulierenden CD34⁺ Stammzellen als ergänzende Methode zur Diagnostik des Schweregrades der Herzinsuffizienz nur wenig geeignet. Mit der Bestimmung der CD34⁺ Zellen ist es allerdings möglich, erkrankte Personen eindeutig von gesunden Personen zu unterscheiden, sodass der Erhebung der Anzahl der CD34⁺ Zellen möglicherweise bei der groben Selektion von Herzinsuffizienzpatienten aus der Population der Gesunden eine Bedeutung zukommen könnte. Die Expression von CD34 ist jedoch nicht ausschließlich auf die Zellen der endothelialen Linie beschränkt, sondern ist auch auf hämatopoietischen Stammzellen zu finden. Beide Zellpopulationen zirkulieren im Blut, sodass die Markierung der CD34⁺ Zellen allein nicht ausreicht, um zwischen zirkulierenden Endothelzellen, hämatopoietischen Stammzellen und EPC zu differenzieren (Khan et al. 2005). Aus diesem Grund scheint deren Aussagekraft in Bezug auf die Unterscheidung der einzelnen Erkrankungsstadien der Herzinsuffizienz nur sehr begrenzt zu sein.

6.3 Variabilität der Anzahl der CD34⁺/CD133⁺ Stammzellen bei Herzinsuffizienzpatienten

Neben den beiden bereits genannten Zellpopulationen erfolgte ebenso die Analyse der Verteilung der CD34⁺/CD133⁺ Stammzellen im Rahmen der hier angefertigten Arbeit. Es zeigt sich hierbei, dass die gesunde Kontrollgruppe signifikant höhere CD34⁺/CD133⁺ Werte aufweist, als die Gruppe der erkrankten Personen. Bei der Betrachtung der einzelnen Herzinsuffizienz-Schwergrade ist festzustellen, dass sich eine signifikante Unterscheidung bezüglich der quantitativen Verteilung der CD34⁺/CD133⁺ Stammzellen zwischen der NYHA-Gruppen I und IV, II und IV sowie III und IV vornehmen lässt, hierbei weisen die höheren Schweregrade jeweils niedrigere Zellzahlen auf, als die milden Erkrankungsstadien. Obwohl eine signifikante Unterscheidung aller Gruppen nicht vorliegt, ist dennoch eine abfallende Tendenz der Zellzahl mit zunehmender Schwere der Herzerkrankung erkennbar.

Die CD34⁺/CD133⁺ Zellen werden als die primitivsten zirkulierenden Vorläuferzellen beschrieben. Es wird vermutet, dass von den CD133⁺ Zellen alle weiteren zirkulierenden Progenitorzellen abstammen. Die Population der CD133⁺ Zellen besteht aus mehreren Subpopulationen, zu denen, neben der Gruppe der CD34⁺/CD133⁺ Zellen, auch die Unterpopulationen der CD34⁺/CXCR4⁺ Zellen sowie der CD34⁺/VEGFR2⁺ Zellen zählen. Die Reduktion einer dieser Zellgruppen kann zum Verlust verschiedener funktioneller Eigenschaften der peripher zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen führen. Da es sich bei den CD34⁺/CD133⁺ Zellen um die primitivsten Vorläuferzellen handelt, von denen weitere endotheliale Progenitorzellpopulationen abstammen, führt eine Verminderung der CD34⁺/CD133⁺ Zellen als direkte Folge zum Verlust der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (Schatteman 2005). Erwiesen werden konnte, dass aus dem Nabelschnurblut gewonnene CD34⁺/CD133⁺ Zellen in Endothelzellen differenzieren, welche einen beständigen Phänotyp sowie die Fähigkeit zum Wachstum und zur Ausbildung von Mikrogefäßen besitzen (Wu et al. 2004). Diese Stammzellen unterliegen ebenfalls dem Einfluss zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren, darunter auch dem granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), dessen Funktion darin besteht hämatopoietische Stammzellen aus dem Knochenmark zu mobilisieren. Zwar führt die Behandlung herzinsuffizienter Patienten mit G-CSF zur verstärkten Mobilisation peripher

zirkulierender CD34⁺/CD133⁺ Zellen, jedoch sind deren funktionelle Eigenschaften nach Stimulation mit G-CSF deutlich beeinträchtigt (Honold et al. 2006). Möglicherweise muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die Zusammensetzung dieser Zellpopulation nicht homogen ist, da belegt wurde, dass die Population der CD34⁺/CD133⁺ Zellen innerhalb des Blutes sowohl hämatopoietische Stammzellen (HSC) als auch endotheliale Progenitorzellen enthält (Wu et al. 2007).

Die CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen von Patienten mit Herzinsuffizienz weisen eine deutlich beeinträchtigte Fähigkeit zur Migration auf und können aus diesem Grund wesentlich schlechter zur Neovaskularisation ischämischer Gewebe beitragen, als CD34⁺/CD133⁺ Zellen, welche gesunden Probanden entnommen wurden (Heeschen et al. 2004). Ebenso besitzen Patienten mit bestehender Koronarer Herzerkrankung eine reduzierte Anzahl an peripher zirkulierenden CD34⁺/CD133⁺ Stammzellen, genauso wie eine verminderte endotheliale Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen, verglichen mit gesunden Personen (Powell et al. 2005). Eine unzureichende Ausbildung koronarer Kollateralen bei Patienten mit KHK findet sich hauptsächlich bei einer verminderten Anzahl von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen sowie negativ beeinflusster chemotaktischer und proangiogenetischer Aktivität (Lambiase et al. 2004). In einer aktuellen Studie wurde, übereinstimmend mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, belegt, dass gesunde Probanden über eine größere Menge an peripher zirkulierenden CD34⁺/CD133⁺ Zellen verfügen, als ältere Menschen, oder Patienten mit vaskulären Erkrankungen (Shaffer et al. 2006). Die möglichen Ursachen für die Verteilung CD34⁺/CD133⁺ Zellen bei herzinsuffizienten Patienten werden zusammen mit denen der Population der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen im folgenden Gliederungspunkt 6.4 diskutiert.

Aus den ermittelten Daten der angefertigten Arbeit kann abgeleitet werden, dass sich die Herzinsuffizienzklassen I und IV, II und IV sowie III und IV in Bezug auf das Vorkommen der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen voneinander differenzieren lassen. Für die übrigen Klassen liegt kein signifikantes Ergebnis vor. Allerdings können die milde und die schwere Form der Herzerkrankung deutlich signifikant voneinander abgegrenzt werden. Dementsprechend ist mit Hilfe der durchflusszytometrischen Bestimmung der CD34⁺/CD133⁺ Zellen eine Unterteilung der Schwere der Herzinsuffizienz in eine leichte und eine ausgeprägte Form möglich. Somit wäre denkbar, dass die Quantifizierung der CD34⁺/CD133⁺ Zellen eine mögliche Ergänzung der Herzinsuffizienzdiagnostik darstellt.

Eine genauere Einteilung der Herzpatienten in die einzelnen NYHA-Klassen erlaubt die Datenlage jedoch nicht. Allerdings lässt sich eine deutliche Differenzierung von klinisch gesunden Probanden und Herzinsuffizienzpatienten durch eine Analyse der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen vornehmen. Durch den Parameter der CD34⁺/CD133⁺ Zellen wäre somit eine Trennung von Gesunden und leicht bzw. schwer Erkrankten möglich.

6.4 Mögliche Ursachen für die quantitative Verteilung der endothelialen Stammzellen bei der Herzinsuffizienz

Weiterhin ist zu diskutieren, aus welchen Gründen sich die Anzahl der peripher zirkulierenden endothelialen Stammzellen mit zunehmendem Schweregrad der Herzinsuffizienz verringert. Es ist denkbar, dass dafür mehrere Mechanismen in Betracht kommen, da es sich bei der Regulation der endothelialen Stammzellen um einen, zum Teil noch unverstandenen Prozess, handelt, der an verschiedenen Stellen modifiziert werden könnte. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgte die Unterteilung des Schweregrades der Herzinsuffizienz, neben der NYHA-Klassifikation, auch jeweils in eine leicht und eine schwer erkrankte Patientenstichprobe, die sich aus den Stadien NYHA I und II (leicht) sowie NYHA III und IV (schwer) zusammensetzte. Wie sich bereits in den Ergebnissen des Vergleichs der einzelnen NYHA-Klassen darstellt, ist auch bei der Einteilung der Herzinsuffizienz in zwei Schweregrade, die Anzahl der EPC im schweren Erkrankungsstadium, verglichen mit der leichten Form, reduziert. Die milde Herzinsuffizienz weist peripher deutlich mehr endotheliale Stammzellen auf, als die schwere Form. Mögliche Erklärungen für diese quantitative Verteilung der EPC werden im Folgenden diskutiert.

Denkbar wäre, dass es aufgrund des zunehmenden Schweregrades der Herzinsuffizienz zu einer fortlaufenden strukturellen Schädigung des Herzens und daraus resultierend zu einem gesteigerten Einbau und somit zu einem erhöhten Bedarf an zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen kommt. In vitro konnte eine Transdifferenzierung adulter peripher im Blut zirkulierender EPC, die mit kardialen Myozyten von Ratten kultiviert wurden, in funktionstüchtige Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Badorff et al. 2003). Die Entwicklung einer progressiven Herzinsuffizienz ist nach einem Myokardinfarkt oft zu beobachten. In einem Tiermodell, bei dem Ratten ein Myokardinfarkt induziert wurde, konnte demonstriert werden, dass humane Vorläuferzellen in der Lage sind in Kardiomyozyten zu transdifferenzieren und zur Vaskulogenese beizutragen. Dies zeigte sich an einer dosisabhängigen Verbesserung der Kapillardichte, einer Hemmung der linksventrikulären Fibrosierung sowie der Erhaltung der linksventrikulären Funktion (Iwasaki et al. 2006). Darüber hinaus üben die CD34⁺ Zellen einen deutlich positiveren Effekt bei intramyokardialer Applikation nach induziertem Myokardinfarkt auf das Herz

von Ratten aus als unselektierte mononucleäre Zellen. Somit können die CD34⁺ Zellen sicherer und potenter zur myokardialen Regeneration beitragen, als andere Untergruppen der peripher zirkulierenden Zellen (Kawamoto et al. 2006). Es lässt sich anhand dieser Forschungsergebnisse vermuten, dass in den schwereren Stadien der Herzinsuffizienz ein gesteigerter Verbrauch an EPC zur Regeneration der myokardialen Destruktionen erforderlich ist und die Zellen aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit in den Klassen III und IV ein niedrigeres Vorkommen aufweisen, als die geringeren Schweregrade.

Eine weitere Erklärung der Progenitorzellverteilung in der hier analysierten Patienten- und Probandenpopulation könnte in einer gestörten Mobilisation der EPC aus dem Knochenmark liegen. Es wurde nachgewiesen, dass an Herzinsuffizienz erkrankte Patienten über Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mit reduzierter migratorischer und proliferativer Aktivität sowie mit der verminderten Fähigkeit zur Neovaskularisation verfügen (Heeschen et al. 2004). Daraus ließe sich schlussfolgern, dass das Vorliegen einer Herzinsuffizienz zur funktionellen Beeinträchtigung von Vorläuferzellen bei diesen Patienten beiträgt. In weiteren Studien konnte aufgezeigt werden, dass das Serum herzinsuffizienter Patienten zur Apoptose von Endothelzellen sowie zur Downregulation der eNOS-(endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase)Syntheserate und somit zu einer schweren Endotheldysfunktion führte (Agnoletti et al. 1999, Valgimigli et al. 2004). Die eNOS übt einen wesentlichen Einfluss auf die Neovaskularisation aus und deren Beeinträchtigung führt, vermittelt über einen Defekt in der Mobilisierung der Progenitorzellen, zur Störung der Neovaskularisation. Durch einen Mangel der eNOS kommt es zur Behinderung der VEGF induzierten Mobilisation der EPC. Der regenerative Prozess bei Patienten mit einer Herzerkrankung könnte aus diesem Grund beeinträchtigt sein, da diese Patienten nur eine verringerte systemische Bioverfügbarkeit von NO aufweisen (Aicher et al. 2003). Als mögliche Ursachen für die quantitative Verteilung der EPC in den verschiedenen Schweregraden der Herzerkrankung dieser Arbeit wäre zum einen denkbar, dass sich bei der leichten Form eine beginnende endotheliale Schädigung manifestiert. Die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion könnte innerhalb eines endogenen Reparatursystems zu einem reaktiv gesteigerten Auftreten der peripheren endothelialen Progenitorzellen führen. Es ist bekannt, dass zirkulierende EPC, als Reaktion auf eine Gewebischämie, in Areale der Neovaskularisation aufgenommen werden und sich in Bereichen endothelialer Schädigungen anreichern (Griese et al. 2003, Takahashi et al. 1999). Dies könnte die erhöhte Anzahl der EPC im leichten Erkrankungsstadium der

NYHA-Klasse I, die im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr EPC aufweist, erklären. Zum anderen wäre vorstellbar, dass bei den Probanden der Kontrollgruppe, die kein kardiovaskuläres Risiko aufweisen, eine vaskuläre oder myokardiale Schädigung als Stimulus fehlt. Deshalb könnte die Mobilisierung der EPC in geringem Maß stattfinden. Dies würde für die reduzierten EPC-Zahlen der Kontrolle im Vergleich zur NYHA-Klasse I sprechen. Ein jedoch basal höheres Zellvorkommen der EPC in der Kontrollgruppe, im Vergleich zu den höheren NYHA-Klassen (NYHA II-IV), könnte auf eine verringerte Mobilisation endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark in den höheren Klassen hindeuten. In einer Studie an Mäusen, welche im Anschluss an einen induzierten Myokardinfarkt, eine Herzinsuffizienz entwickelten, konnte die Reduktion der Anzahl und der Variabilität von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark beobachtet werden. Es zeigte sich in diesem Tiermodell ebenfalls eine gesteigerte Apoptoserate der Progenitorzellen. Die verminderte hämatopoietische Aktivität des Knochenmarks bei den herzinsuffizienten Mäusen ist vermutlich aufgrund einer verstärkten Aktivität der TNF- α /Fas Moleküle bedingt, welche in den Lymphozyten hochreguliert sind (Iversen et al. 2002). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz mit einer Suppression des Knochenmarks und folglich einer Reduzierung der peripher zirkulierenden Vorläuferzellen einhergeht. Dies könnte das vermehrte Vorkommen der EPC im Blut der gesunden Probanden und die Verminderung der endothelialen Stammzellen bei Herzinsuffizienten begründen.

Eine weitere Beeinflussung der endothelialen Vorläuferzellen durch TNF- α wird bei der Herzinsuffizienz vermutet. Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz wiesen, im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen, erhöhte TNF- α -Konzentrationen auf (Levine et al. 1990). Zwischen den peripheren endothelialen Stammzellen und den TNF- α -Spiegeln herzinsuffizienter Patienten wurde von Valgimigli et al 2004 eine umgekehrte Korrelation demonstriert. In den frühen Phasen der Herzerkrankung, in denen der TNF- α -Spiegel nicht erhöht vorlag, fand, möglicherweise aufgrund der oben genannten Endotheldestruktionen im Rahmen der Herzerkrankung, die bereits oben beschriebene reaktive Steigerung der EPC statt. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium stieg die TNF- α Konzentration an und eine Reduktion der EPC wurde beobachtet. Wie bereits erwähnt inhibiert TNF- α die physiologische Hämatopoiese im Knochenmark (Iversen et al. 2002). Dementsprechend wäre denkbar, dass TNF- α , mit dem Stadium der Herzinsuffizienz zunehmend, die Mobilisation der endothelialen Stammzellen in den hohen NYHA-Klassen beeinträchtigt.

Allerdings wurde kürzlich eine Studie veröffentlicht, die dem TNF- α -Rezeptor 2 (TNFR2/p75) eine wesentliche Bedeutung bei der ischämiebedingten Neovaskularisation durch endotheliale Vorläuferzellen beimisst (Goukassian et al. 2007). Ein Tiermodell mit Mäusen zeigte, dass das Überleben der Endothelzellen und der EPC, die Expression von VEGF, die Mobilisierung sowie die Differenzierung der endothelialen Progenitorzellen und die Ausbildung neuer Kollateralgefäße vom Signaltransduktionsweg des TNFR2/p75 abhängig sind. In dieser Forschungsarbeit wurde jedoch keine Aussage über den humanen TNFR2/p75 und dessen Verteilung im menschlichen Organismus getroffen. Die Verteilung oder das Vorkommen des TNFR2/p75 könnte bei der chronischen Herzinsuffizienz möglicherweise verringert sein. Auf diese Weise wäre der positive Effekt des TNFR2/p75 aufgehoben und, als Resultat des Überwiegens der toxischen Einflüsse des TNF- α , die Anzahl der zirkulierenden EPC reduziert. Eine weitere Studie deutet daraufhin, dass sowohl der lösliche TNF- α -Rezeptor1 (sTNFR1), als auch der lösliche TNF- α -Rezeptor2 (sTNFR2) in den vorangeschrittenen Stadien der Herzinsuffizienz in höherer Konzentration bestimmbar sind und als unabhängige Vorhersagewerte für ein erhöhtes Mortalitätsrisiko dienen. Als am besten geeigneter unabhängiger Vorhersagewert für die Mortalität bei chronischer Herzinsuffizienz stellte sich in dieser Arbeit der Spiegel des frei zirkulierenden TNFR2 dar (Deswal et al. 2001). Diese gegensätzlichen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Funktion von TNF- α und seinen löslichen sowie membrangebundenen Rezeptoren gegenwärtig noch nicht vollständig geklärt ist. Wie jedoch beschrieben, existieren deutliche Hinweise darauf, dass TNF- α zu einer Beeinträchtigung und Verminderung der EPC, vor allem mit Zunahme dessen Konzentration in den hohen NYHA-Klassen, führt. Dieser Sachverhalt könnte die Verteilung der endothelialen Progenitorzellen -abnehmend mit steigender NYHA-Klasse- in der hier vorliegenden Studie erklären. Es ist aber davon auszugehen, dass TNF- α und seine Rezeptoren nicht die einzigen Zytokine sind, die an der Regulation der endothelialen Stammzellen im allgemeinen, und speziell bei der chronischen Herzinsuffizienz, beteiligt sind (Agnoletti et al. 1999, Valgimigli et al. 2004). Vielmehr sind die peripher zirkulierenden EPC einer Reihe von Zytokinen wie beispielsweise TNF- α oder IL-6 exponiert, die -zum Teil in Kombination- zu einer Reduktion der endothelialen Vorläuferzellen bei Herzinsuffizienz führen (Kissel et al. 2007). Möglicherweise würde die Erforschung der Verteilung des TNFR2/p75 bei herzinsuffizienten Patienten in nachfolgenden Studien weitere Aufschlüsse über die Regulationsmechanismen und die von TNFR2/p75 vermittelten Signaltransduktionswege, denen die endothelialen Stammzellen

im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz ausgesetzt sind, offen legen und auf diese Weise zu neuen therapeutischen Optionen führen.

Die in ischämischen Gewebsarealen hervorgerufene zelluläre Antwort führt zur Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine, die eine Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen und die Neovaskularisation ischämischen Gewebes fördern (Takahashi et al. 1999). Diese zelluläre Reaktion wird reguliert von Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren (HIFs), die durch eine niedrige Sauerstoffkonzentration im Gewebe aktiviert werden. Die HIFs lösen die Expression multipler proangiogener Faktoren aus und stimulieren somit die Revaskularisierung der ischämischen Gewebe (Semenza 2003). Bei der Herzinsuffizienz ist die Kapillardichte im Myokard vermindert und der erhöhte Sauerstoffbedarf des hypertrophierten Herzens kann durch die reduzierte Blut- und Sauerstoffversorgung nicht mehr gedeckt werden. Die ungenügende Kapillardichte führt zur myokardialen Hypoxie, welche eine Degeneration von Kardiomyozyten, interstitielle Fibrose und Entstehung einer kardialen Dysfunktion zur Folge hat. Durch proangiogene Faktoren, freigesetzt von Kardiomyozyten und Gefäßzellen, wird die Kapillarisation des Myokards gesteuert. Die Expression und Synthese dieser Faktoren ist abhängig von Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 und STAT₃ (Signal transducer and activator of transcription₃) (Hilfiker-Kleiner et al. 2006). Der Mediator HIF-1 induziert in hypoxischen Endothelzellen und ischämischen Geweben selektiv und in Relation zum reduzierten Sauerstoffangebot die Expression von SDF-1 (stromal cell-derived factor-1). Dieser Signaltransduktionsweg ist verantwortlich dafür, dass sich die zirkulierenden EPC in ischämischem Gewebe anreichern (Ceradini et al. 2004). Die Bindung von SDF-1 an seinen Rezeptor CXCR4 auf zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen erhöht deren Migration, Adhäsion und Homing (Besiedlung) im ischämischen Gewebe. Weitere durch HIF-1 regulierte bedeutsame Mediatoren der EPC-Mobilisierung sind VEGF und Erythropoietin (EPO) (Ben-Shoshan und George 2007). Anhaltende hohe Drücke, die das Herz bewältigen muss, führen zu einer Akkumulation des p53 Proteins in den Zellen und daraus resultierend zur Hemmung des HIF-1-vermittelten Kapillarwachstums. Als Folge dessen entwickeln sich sowohl eine maladaptive Hypertrophie, als auch eine linksventrikuläre Dysfunktion des Herzens. Darüber hinaus hemmt p53 die kardiale Angiogenese und trägt auf diese Weise wesentlich zur Hypertrophie des Herzens und nachfolgend zur Ausprägung der Herzinsuffizienz bei (Sano et al. 2007). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass bei herzinsuffizienten Patienten der

Signaltransduktionsweg der Mobilisation endothelialer Progenitorzellen gestört ist und aus diesem Grund die Anzahl der EPC bei Herzinsuffizienzpatienten vermindert ist. Es ist bekannt, dass es sich bei der Herzinsuffizienz um eine progressive Erkrankung mit Zunahme der strukturellen und funktionellen Schädigung des Herzens handelt (Mann und Bristow 2005). Dementsprechend könnte angenommen werden, dass sich auf Grund der Anreicherung von p53 im Myokard die Hemmung der HIF-1-induzierten Kapillarisation des Herzens mit Zunahme der Erkrankung verstärkt und das Vorkommen der EPC dadurch reduziert. Dieser Gesichtspunkt könnte die -in der vorliegenden Studie- signifikant geringere Anzahl der endothelialen Stammzellen in den NYHA-Klassen III und IV, verglichen mit den leichteren Erkrankungsstadien NYHA I und II, erklären. Allerdings ist die Mobilisierung der EPC von multiplen Einflussfaktoren abhängig, sodass es durchaus möglich erscheint, dass weitere Mediatoren bei der schweren Herzinsuffizienz die Anzahl der endothelialen Vorläuferzellen beeinflussen.

Des Weiteren könnte eine reduzierte Überlebenszeit der EPC bei der Herzinsuffizienz von Bedeutung sein. Eine aktuelle Studie belegt, dass in den höheren NYHA-Klassen der Herzinsuffizienz eine gesteigerte Apoptose von Progenitorzellen stattfindet (Geft et al. 2008). Es konnte eine positive Korrelation zwischen der NYHA-Klasse und dem Vorkommen der apoptotischen Zellen festgestellt werden. Zwar wurden von Geft et al ausschließlich CD34 positive Zellen untersucht. Dennoch kann vermutet werden, dass auch die CD34/CD133/VEGFR-2 positiven endothelialen Stammzellen bei schwer herzinsuffizienten Patienten aufgrund der gesteigerten Apoptoserate von Progenitorzellen vermindert sind, da es sich bei den EPC um eine Subpopulation der CD34 positiven Zellen handelt. Aufgrund dieser Erkenntnisse könnte die reduzierte Anzahl der endothelialen Progenitorzellen bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nachvollzogen werden. Ein möglicher weiterer Gesichtspunkt wäre, dass die peripher zirkulierenden endothelialen Stammzellen schädigenden Einflüssen, wie oxidativer Stress und zirkulierende Substanzen mit negativen Effekten, im Blutkreislauf ausgesetzt sind und zu einer Störung der Funktionsfähigkeit der Zellen führen (Thum et al. 2007). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Entzündungsparameter CrP die Differenzierung, das Überleben und die angiogenen Wirkungen der EPC direkt -zum Teil über die Abschwächung der eNOS-Expression der EPC- hemmt (Verma et al. 2004). Darüber hinaus induziert CrP die Bildung von Sauerstoffradikalen, indem es die Expression der antioxidativen Enzyme, mit denen die EPC ausgestattet sind, verändert.

Auf diese Weise induziert CrP den Zelltod der EPC und führt zur Beeinträchtigung der Endothelregeneration (Fujii et al. 2006). Vor allem die schwere Herzinsuffizienz in den NYHA-Klassen III und IV ist durch eine systemische Inflammation mit signifikant erhöhten CrP Plasmaspiegeln und vermehrter Produktion freier Sauerstoffradikale gekennzeichnet (White et al. 2006). Es kann somit vermutet werden, dass durch diese pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der Herzinsuffizienz die EPC, besonders in den NYHA-Gruppen III und IV, eine nur verkürzte Überlebenszeit besitzen und deshalb in diesen Stadien deutlich geringer repräsentiert sind. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die intensive medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz in den höheren Stadien ebenfalls einen ungünstigen Effekt auf die EPC ausübt. Um dies zu eruieren werden neu angelegte Studien notwendig sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich untersucht, ob weitere Faktoren einen Einfluss auf die Quantität der endothelialen Vorläuferzellen im Blutkreislauf ausüben. Dabei wurde ermittelt, dass die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen -neben dem Schweregrad der Herzinsuffizienz- vom Lebensalter der Patienten/Probanden beeinflusst wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass das Alter die Anzahl der EPC statistisch signifikant beeinträchtigt. In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, dass zwischen einer altersabhängiger Dysfunktion des Endothels und der Anzahl und Funktion der endothelialen Stammzellen ein Zusammenhang besteht. Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die EPC in ihren funktionellen Eigenschaften, wie beispielsweise die Proliferation und Migration, sowie in ihrem Überleben und der Fähigkeit zur Ausprägung von Kolonien oder kapillar-ähnlichen Strukturen durch das Alter grundlegend beeinträchtigt werden (Heiss et al. 2005). Demnach ereignet sich aufgrund der eingeschränkten Funktionsfähigkeit der EPC eine altersabhängige Störung der Neovaskularisation. Parallel dazu findet mit zunehmenden Alter und der anhaltenden Exposition von Risikofaktoren eine Erschöpfung des Knochenmarks statt, die die Gefäßreparatur durch die Progenitorzellen beeinflusst (Rauscher et al. 2003). Neben der verringerten proliferativen Aktivität der EPC mit zunehmendem Lebensalter kommt es zur Steigerung der Apoptoseraten der Zellen (Scheubel et al. 2003). Ebenso bekannt ist, dass die Freisetzung von angiogenen Wachstumsfaktoren, besonders von VEGF und PDGF (Platelet-derived growth factor), als Reaktion auf Gewebischämien, im Alter beeinträchtigt ist (Kinnaird et al. 2008). Physiologisch stimuliert VEGF die Mobilisation der endothelialen Stammzellen aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation und

steigert somit die Zahl der EPC (Asahara et al. 1999). Aus diesem Grund könnte vermutet werden, dass die verminderte Freisetzung von VEGF im Alter zu einer Reduktion der Anzahl der endothelialen Progenitorzellen führt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bereits das Lebensalter allein, ohne zusätzliche Erkrankungen, zur Verminderung der Anzahl der endothelialen Stammzellen führt. Die genauen Mechanismen, die zu einer alters-vermittelten Endotheldysfunktion und zur Reduktion der EPC führen, sind noch nicht vollständig geklärt (Heiss et al. 2005). Fraglich bleibt ebenso, ob die endotheliale Schädigung im Alter das Resultat der reduzierten Anzahl der endothelialen Vorläuferzellen ist, oder ob durch die Gefäßdestruktion der EPC-Verbrauch derartig gesteigert ist, dass sich die periphere Anzahl der Zellen verringert. Es werden weitere Studien erforderlich sein, um diese Einflüsse detaillierter bestimmen zu können und gegebenenfalls gezielte therapeutische Methoden für ältere Patienten zu entwickeln.

Abschließend ist zu bemerken, dass die peripher zirkulierenden endothelialen Stammzellen von einer Vielzahl von Faktoren, einschließlich unterschiedlicher Erkrankungen, medikamentöser Behandlung oder endogener Regulationsmechanismen in ihrer Quantität, aber auch in ihrer Funktion beeinflusst werden können. So weisen beispielsweise Personen mit Diabetes mellitus Typ II eine gestörte Proliferation und Aufnahme der EPC in Gefäße auf (Tepper et al. 2002). Kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie erhöhte LDL-Spiegel, das Alter oder eine positive Familienanamnese für die KHK, üben einen negativen Einfluss auf die EPC aus. Darüber hinaus führt der Nikotinabusus deutlich zur Reduktion der EPC, während der arterielle Hypertonus die Migrationsfähigkeit der Zellen verschlechtert (Vasa et al. 2001b). Weiterhin sind bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt gegenüber gesunden Personen, deutlich mehr zirkulierende EPC und unreifere Vorläufer wie die CD34⁺ Stammzellen nachzuweisen (Shintani et al. 2001). Dagegen wirkt sich regelmäßiges moderates körperliches Training bei Patienten mit KHK oder mit kardiovaskulären Risikofaktoren positiv auf die Anzahl und Funktion der zirkulierenden EPC über einen NO-abhängigen, antiapoptotischen Effekt aus und führt auf diese Weise zu einer verbesserten Gefäßfunktion (Laufs et al. 2004, Steiner et al. 2005). Von den Hydroxy-Methylglutaryl (HMG)-CoA Reduktasehemmern (Statine bzw. CSE-Hemmer) ist bekannt, dass sie zur Steigerung des Vorkommens der peripher zirkulierenden EPC beitragen sowie deren Adhäsionsfähigkeit und Differenzierung erhöhen (Dimmeler et al. 2001, Walter et al. 2002). Der durch H₂O₂ induzierten Apoptose der EPC kann durch die Statine vorgebeugt werden (Urbich et al. 2005b). Bei Patienten mit KHK kann durch CSE-

Hemmer eine vermehrte Zirkulation der EPC und deren verbesserte funktionelle Aktivität erzielt werden (Vasa et al. 2001a). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden einige dieser genannten Einflussgrößen auf die endothelialen Stammzellen untersucht. In die multiple Regressionsanalyse eingeschlossen waren unter anderem das Vorliegen eines Diabetes mellitus, KHK, arterieller Hypertonus, das Alter, die NYHA-Klasse sowie eine positive Raucheranamnese. Bei dieser Untersuchung kann nur eine Beeinflussung der Zellen durch das Lebensalter und die NYHA-Klasse gesichert werden, für alle übrigen Parameter wurde kein Effekt auf die EPC ermittelt. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf die Kollektivgröße oder die unselektierte Patientenstichprobe zurückzuführen. Oftmals lag bei den Patienten eine Komorbidität vor. Daher ist durchaus vorstellbar, dass die Auswirkungen der einzelnen Faktoren nur schwer zu eruieren sind. Aus diesem Grund können die in der Literatur beschriebenen Beeinträchtigungen der EPC in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Verteilung der peripher zirkulierenden EPC bei herzinsuffizienten Patienten von mehreren Faktoren abhängig sein kann. Demnach ist es möglich, dass in den hohen NYHA-Klassen ein gesteigerter Bedarf an EPC, eine reduzierte Mobilisierung der Zellen aus dem Knochenmark oder einer Behinderung der Zellmigration in geschädigtes Gewebe vorliegt. Eine verminderte Überlebenszeit der endothelialen Stammzellen im schweren Krankheitsstadium kann, genauso wie der Einfluss einer Vielzahl von Erkrankungen und Komorbidität der Patienten, in Betracht kommen. Sehr wahrscheinlich üben verschiedene Mechanismen einen Einfluss -quantitativ oder funktionell- auf die EPC aus. Genauere Aussagen zur Ursache der Abhängigkeit der endothelialen Progenitorzellen von den einzelnen Stadien der Herzinsuffizienz können durch diese Studie nicht erfolgen, da keine Bestimmung weiterer Serumparmeter, wie beispielsweise VEGF oder TNF- α und dessen Rezeptoren bzw. weiterführende Untersuchungen durchgeführt wurden. Um die genauen Funktionen der endothelialen Progenitorzellen in der Physiologie und der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz zu verstehen, werden in Zukunft weitere Forschungsarbeiten erforderlich sein. Die EPC stellen eine Basis für neue Therapiestrategien im Rahmen der Herzinsuffizienz dar und wurden, wie bereits erwähnt, in ersten klinischen Studien therapeutisch angewendet.

6.5 Endotheliale Progenitorzellen - eine heterogene Zellpopulation

In der Literatur ist nach wie vor keine einheitliche Definition der endothelialen Stammzellen beschrieben. Es werden sowohl die CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen, als auch die CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Stammzellen als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet und deren Eigenschaften sowie Vorkommen unter den verschiedensten Gesichtspunkten untersucht (Hristov und Weber 2004, Lambiase et al. 2004, Nonaka-Sarukawa et al. 2007, Valgimigli et al. 2004, Wu et al. 2007, Peichev et al. 2000). Fraglich ist jedoch, welche der drei, in dieser Arbeit beleuchteten, Zellpopulationen sich am ehesten eignet -über die Bestimmung der entsprechenden Zellhäufigkeit- eine verlässliche Aussage über den Schweregrad der Herzinsuffizienz zu treffen. Bei dem Vergleich der Zellpopulationen, die in dieser angefertigten Arbeit isoliert, untersucht und quantifiziert wurden, zeigt sich, dass nicht alle Zellformen gleich gut geeignet sind, eine Aussage über den Schweregrad der Herzinsuffizienz zu treffen. Die Analyse der CD34 positiven Stammpopulation legt dar, dass die Anzahl der CD34 positiven Zellen nur eine eindeutige Unterscheidung zwischen erkrankten und gesunden Personen zulässt. Darüber hinaus ließe sich, im Zusammenhang einer durchgeführten Diagnostik der Herzinsuffizienz, anhand der CD34⁺ Zellen keine Einteilung der Patienten in die einzelnen Schweregrade der Herzerkrankung vornehmen. Der Erhebung der Anzahl der CD34 positiven Zellen kann daher möglicherweise nur im Rahmen einer groben Selektion von Herzinsuffizienzpatienten eine Bedeutung zukommen, sodass erkrankte Personen von nicht erkrankten Personen differenziert werden könnten. Da es sich bei den CD34 positiven Zellen um eine weitgehend unselektierte Stammzellpopulation handelt, erscheint es plausibel, dass deren Aussagekraft in Bezug auf die Differenzierung der einzelnen Erkrankungsstadien der Herzinsuffizienz sehr begrenzt ist. Bei der Betrachtung der gewonnenen Ergebnisse zur Population der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen fällt auf, dass diese bereits besser geeignet erscheint, um eine Einteilung der Schwere der Herzerkrankung vorzunehmen. Anhand der CD34⁺/CD133⁺ Zellen ist, nach Datenlage der vorliegenden Arbeit, eine Differenzierung der Herzinsuffizienz in eine leichte und eine ausgeprägte Form möglich. Weiterhin kann, aufgrund des signifikant vermehrten Vorkommens der CD34⁺/CD133⁺ Zellen in der Gruppe der gesunden Probanden, diese deutlich von der Gruppe der erkrankten Personen abgegrenzt werden. Durch die Bestimmung CD34⁺/CD133⁺ Zellen wäre somit eine Trennung von Gesunden

und leicht bzw. schwer erkrankten Patienten möglich. Es handelt sich jedoch auch bei den CD34⁺/CD133⁺ Zellen um eine noch recht unreife Unterpopulation von Vorläuferzellen (Heeschen et al. 2004, Schatteman 2005), sodass auch diese nur bedingt dazu beiträgt, eine genaue Differenzierung des Herzinsuffizienzschweregrades zu ermöglichen. Die Untersuchung der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ endothelialen Stammzellen liefert dagegen spezifischere Ergebnisse. Es wird ersichtlich, dass sich die einzelnen Schweregrade der Herzinsuffizienz in der untersuchten Patientenstichprobe in Bezug auf das ermittelte Vorkommen der EPC deutlich signifikant voneinander unterscheiden. Eine Ausnahme bilden dabei die Klassen III und IV, vermutlich aufgrund des geringeren Stichprobenumfangs der Klasse IV. Auch die gesunde Kontrollgruppe weist eine signifikant höhere Anzahl an endothelialen Stammzellen auf, als die NYHA-Gruppen II bis IV. Vorstellbar wäre somit, dass bei Patienten die klinisch nur schlecht einem Schweregrad der Herzinsuffizienz zugeordnet werden können, eine -die Herzinsuffizienzdiagnostik ergänzende- Quantifizierung der EPC die Einstufung in die entsprechende NYHA-Klasse ermöglicht, woraus sich, zum Teil wesentliche, therapeutische Konsequenzen ableiten können. Die spezifischeren Ergebnisse der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ endothelialen Stammzellen im Vergleich zu den CD34⁺ und den CD34⁺/CD133⁺ Zellen könnten sich durch die Heterogenität der endothelialen Stammzellpopulation erklären lassen. Der Begriff EPC wird für eine sehr gemischte Zellpopulation verwendet, die sich aus verschiedenen Progenitorzellen zusammensetzt (Zampetaki et al. 2008). Es liegen Daten vor die veranschaulichen, dass endotheliale Progenitorzellen neben dem Knochenmark aus verschiedenen Geweben ins periphere Blut freigesetzt werden können und zum zirkulierenden Pool der EPC beitragen. Dazu konnten bisher in Tiermodellen EPC aus der Milz (Wassmann et al. 2006, Werner et al. 2003), aus dem Darm und der Leber isoliert werden (Aicher et al. 2007). Menschliche Fettzellen differenzieren in vitro in Endothelzellen (Miranville et al. 2004, Sengenès et al. 2007) und in der Adventitia der Aortenwurzel im Mausmodell finden sich Vorläuferzellen (Hu et al. 2004). In der menschlichen Gefäßwand, in einem Areal zwischen Adventitia und Media, konnten weitere EPC identifiziert werden (Zengin et al. 2006). Diese Beobachtungen veranschaulichen, dass ein bedeutender Anteil der Endothelzellen von Geweben außerhalb des Knochenmarks stammt. Daraus kann abgeleitet werden, dass die peripher zirkulierenden EPC aus verschiedenen Quellen stammen, einem Pool von Vorläuferzellen bilden und somit an, zum Teil entfernt gelegenen, geschädigten oder ischämischen Gebieten ihre Funktionen entfalten können. Ein weiteres Indiz für die Heterogenität der

EPC Population ist eine kürzlich veröffentlichte Arbeit in der angenommen wird, dass es sich bei den CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ Zellen nicht um endotheliale Progenitorzellen handelt, sondern um primitive hämatopoietische Vorläuferzellen (Case et al. 2007). Dies zeigt, dass nach wie vor eine einheitliche, allgemein anerkannte Definition der EPC Population fehlt. Allerdings beziehen sich die Ergebnisse von Case et al auf Stichprobenumfänge von jeweils zwischen drei und sechs Probanden und sind somit verhältnismäßig gering. Weiterhin unterstreichen Studien den Einfluss der Zellisolationsprotokolle auf die funktionellen Fähigkeiten der Vorläuferzellen und heben die Heterogenität der EPC-Population hervor (Seeger et al. 2007, Khan et al. 2005). Es wird deutlich, dass in diesem Zusammenhang noch erheblicher Forschungsbedarf besteht.

7 Schlussfolgerungen

Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse lässt sich feststellen, dass die Quantifizierung der peripher zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen geeignet ist, um zwischen den einzelnen Schweregraden der Herzinsuffizienz, ausgenommen NYHA-Klasse III und IV sowie Kontrolle und NYHA-Klasse I, zu differenzieren. Allerdings ist es dazu erforderlich, die endothelialen Stammzellen mit Hilfe einer Antikörperkombination gegen die Oberflächenantigene CD34, CD133 und VEGFR-2 zu detektieren, da die Aussagekraft der CD34 positiven und der CD34/CD133 positiven Stammzellpopulationen bezüglich des Schweregrades der Herzinsuffizienz eingeschränkt ist. Für die zukünftige Diagnostik der Herzinsuffizienz sowie zur Verlaufsbeobachtung hinsichtlich der Beurteilung einer möglichen Verschlechterung der Erkrankung, könnte die durchflusszytometrische Bestimmung der peripheren EPC eine ergänzende, nicht invasive Methode für den Patienten darstellen. Aus der genaueren Einschätzung der entsprechenden NYHA-Klasse des Patienten könnte sich für die Erkrankten eine bedeutsame therapeutische Konsequenz ableiten. Möglicherweise gelingt es durch die Quantifizierung der peripheren EPC klinisch schwer klassifizierbare Patienten exakter einem Schweregrad zuzuordnen und schneller eine adäquate Therapie einzuleiten. Zur Etablierung dieses Verfahrens als eine sichere diagnostische Methode ist es jedoch erforderlich, ein Zeit und Kosten sparenderes Protokoll zur quantitativen Bestimmung der endothelialen Progenitorzellen einzusetzen, um diese Methode den Bedürfnissen der klinischen Diagnostik anzupassen. Weiterhin wäre es notwendig, ein standardisiertes Protokoll zur Isolation der EPC zu entwickeln und einheitliche Grenzwerte für die einzelnen NYHA-Klassen festzulegen, um eine größtmögliche Reliabilität zu erzielen. Denn momentan liegt keine einheitliche Definition der endothelialen Progenitorzellen vor und eine Vielzahl von Untergruppen sind, auf der Grundlage verschiedener Oberflächenantigenexpression und funktioneller Aktivität, bisher als endotheliale Stammzellen definiert worden. Die Durchflusszytometrie hat sich allerdings bei der Identifizierung und Auszählung der EPC als zu bevorzugende Methode dargestellt (Khan et al. 2005).

Darüber hinaus können sich auch durch die EPC selbst therapeutische Optionen ergeben. Erste Studien, bei denen Patienten mit endothelialen Vorläuferzellen behandelt wurden, zeigten bereits positive Resultate (Perin et al. 2003, Silva et al. 2004). Möglicherweise könnten durch die -gegebenenfalls stadienorientierte- Anwendung der EPC die Morbidität, die Hospitalisierungsrate und die Mortalität der Herzinsuffizienz reduziert werden. Bisher fehlen jedoch genauere Untersuchungen zu den unmittelbaren und den langfristigen Wirkungen sowie mögliche unerwünschte Effekte der CD34/CD133/VEGFR-2 positiven beim Menschen, sodass auf diesem Gebiet ebenfalls intensiver Forschungsbedarf besteht.

Weiterhin muss in zukünftigen Studien geklärt werden, ob zwischen den beiden Geschlechtern Unterschiede in der quantitativen Verteilung der peripheren EPC bei der Herzinsuffizienz bestehen. Zum einen um mögliche Grenzwerte der EPC anzupassen und zum anderen um gegebenenfalls unterschiedliche therapeutische Strategien zu entwickeln. Aufgrund des großen Interesses an den zirkulierenden EPC ist auch die Etablierung von Antikörpern gegen neue Oberflächenantigene zur exakten Identifizierung der endothelialen Vorläuferzellen nicht auszuschließen bzw. werden die bereits genutzten Zellantigene in ihrer Kombination zur Detektierung der EPC optimiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für die Verteilung der peripher zirkulierenden endothelialen Stammzellen in den verschiedenen Schweregraden der Herzinsuffizienz mehrere Ursachen in Betracht kommen könnten. Dazu zählen die reduzierte Mobilisation der EPC aus dem Knochenmark, möglicherweise aufgrund dessen funktioneller Einschränkung, die gestörte Migration der EPC in das Gewebe, die Erschöpfung der zirkulierenden EPC bzw. ein gesteigerter Bedarf an endothelialen Stammzellen sowie das verminderte Überleben der Zellen in der peripheren Zirkulation. Darüber hinaus wird die Anzahl der EPC negativ durch das Alter der Patienten beeinflusst, wie auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Inwieweit das Vorkommen der EPC als prognostischer Marker für den Verlauf der Herzinsuffizienz dienen kann und welche Rolle die Zellen im Rahmen der Physiologie und Pathophysiologie der Herzinsuffizienz spielen, ist derzeit noch nicht vollständig verstanden und es bedarf weiterer Studien, um diese Fragen zu klären.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ABBOTT. 1999. Cell-Dyn 4000 Technik, Methodik und Funktion
- Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. 2004. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, 110 (21):3300-3305.
- Agnoletti L, Curello S, Bachetti T, Malacarne F, Gaia G, Comini L, Volterrani M, Bonetti P, Parrinello G, Cadei M, Grigolato PG, Ferrari R. 1999. Serum from patients with severe heart failure downregulates eNOS and is proapoptotic: role of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation*, 100 (19):1983-1991.
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*, 9 (11):1370-1376.
- Aicher A, Rentsch M, Sasaki K, Ellwart JW, Fandrich F, Siebert R, Cooke JP, Dimmeler S, Heeschen C. 2007. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res*, 100 (4):581-589.
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*, 1 (10):1024-1028.
- Andreou I, Tousoulis D, Tentolouris C, Antoniades C, Stefanadis C. 2006. Potential role of endothelial progenitor cells in the pathophysiology of heart failure: clinical implications and perspectives. *Atherosclerosis*, 189 (2):247-254.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275 (5302):964-967.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J*, 18 (14):3964-3972.
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. 2002. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 106 (24):3009-3017.
- Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*, 107 (7):1024-1032.
- Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W. 2005. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation*, 112 (9 Suppl):I178-183.
- BD. 2008. Einführung in die Durchflusszytomtrie
[www.genome.tugraz.at/GrundlBiomTechnik/FACS.pdf]. BD Biosciences Customer Education.

- Ben-Shoshan J, George J. 2007. Endothelial progenitor cells as therapeutic vectors in cardiovascular disorders: from experimental models to human trials. *Pharmacol Ther*, 115 (1):25-36.
- Benjamin LE, Keshet E. 1997. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (16):8761-8766.
- Bonow RO, Udelson JE. 1992. Left ventricular diastolic dysfunction as a cause of congestive heart failure. Mechanisms and management. *Ann Intern Med*, 117 (6):502-510.
- Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. 1991. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol*, 138 (1):213-221.
- Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, Isner JM. 1996. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest*, 97 (2):469-476.
- Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. 1991. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*, 3 (2):175-184.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380 (6573):435-439.
- Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzahe MR, Bhavsar JR, Yoder MC, Haneline LS, Ingram DA. 2007. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*, 35 (7):1109-1118.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 10 (8):858-864.
- Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, Loken MR. 1987. Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol*, 15 (1):10-17.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. 1996. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 271 (2):736-741.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. 1989. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*, 84 (5):1470-1478.
- Davidson MH, Maki KC, Marx P, Maki AC, Cyrowski MS, Nanavati N, Arce JC. 2000. Effects of continuous estrogen and estrogen-progestin replacement regimens on cardiovascular risk markers in postmenopausal women. *Arch Intern Med*, 160 (21):3315-3325.
- DESTATIS. 2008. Herzinsuffizienz häufigster Grund für einen Krankenhausaufenthalt in 2006
[\[http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2008/03/PD08_095_231,templateId=renderPrint.psm\]](http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2008/03/PD08_095_231,templateId=renderPrint.psm). Statistisches Bundesamt, Pressestelle.
- Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. 2001. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation*, 103 (16):2055-2059.

- DiGiusto D, Chen S, Combs J, Webb S, Namikawa R, Tsukamoto A, Chen BP, Galy AH. 1994. Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood*, 84 (2):421-432.
- Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. 2001. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 108 (3):391-397.
- Erdmann E. 2006. Chronische Herzinsuffizienz. In: Erdmann E, Hrsg. *Klinische Kardiologie*. 6te Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 205-335.
- Ergun S, Tilki D, Hohn HP, Gehling U, Kilic N. 2007. Potential implications of vascular wall resident endothelial progenitor cells. *Thromb Haemost*, 98 (5):930-939.
- Eriksson H, Svardsudd K, Larsson B, Ohlson LO, Tibblin G, Welin L, Wilhelmsen L. 1989. Risk factors for heart failure in the general population: the study of men born in 1913. *Eur Heart J*, 10 (7):647-656.
- Favard C, Moukadiri H, Dorey C, Praloran V, Plouet J. 1991. Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine. *Biol Cell*, 73 (1):1-6.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380 (6573):439-442.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. 1990. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, 75 (12):2417-2426.
- Fowler NO, Holmes JC. 1975. Blood viscosity and cardiac output in acute experimental anemia. *J Appl Physiol*, 39 (3):453-456.
- Frazier OH, Baldwin RT, Eskin SG, Duncan JM. 1993. Immunochemical identification of human endothelial cells on the lining of a ventricular assist device. *Tex Heart Inst J*, 20 (2):78-82.
- Froeschl M, Haddad H, Commons AS, Veinot JP. 2005. Thyrotoxicosis-an uncommon cause of heart failure. *Cardiovasc Pathol*, 14 (1):24-27.
- Fujii H, Li SH, Szmítko PE, Fedak PW, Verma S. 2006. C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (11):2476-2482.
- Geft D, Schwartzberg S, Rogowsky O, Finkelstein A, Ablin J, Maysel-Auslender S, Wexler D, Keren G, George J. 2008. Circulating apoptotic progenitor cells in patients with congestive heart failure. *PLoS ONE*, 3 (9):e3238.
- Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. 2000. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, 95 (10):3106-3112.
- Genth-Zotz S, von Haehling S, Blankenberg S. 2004. [Immunactivation in chronic heart failure. Inflammatory mediators]. *Z Kardiol*, 93 Suppl 4:IV24-30.
- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. 2001. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*, 88 (2):167-174.
- Goukassian DA, Qin G, Dolan C, Murayama T, Silver M, Curry C, Eaton E, Luedemann C, Ma H, Asahara T, Zak V, Mehta S, Burg A, Thorne T, Kishore R, Losordo DW. 2007. Tumor necrosis factor-alpha receptor p75 is required in ischemia-induced neovascularization. *Circulation*, 115 (6):752-762.
- Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. 2003. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells

- into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation*, 108 (21):2710-2715.
- Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE. 1997. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med*, 336 (25):1769-1775.
- Guan K, Hasenfuss G. 2007. Do stem cells in the heart truly differentiate into cardiomyocytes? *J Mol Cell Cardiol*, 43 (4):377-387.
- Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci S. 2003. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*, 996:141-151.
- Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. 2004. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*, 109 (13):1615-1622.
- Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. 2005. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 45 (9):1441-1448.
- Hermann H-P, Hasenfuss G. 2004. Therapie der Herzinsuffizienz. *Intensivmed*, 41:451-464.
- Hess O. 2003. Herzinsuffizienz: Definition, Ursachen und Formen. *Schweiz Med Forum*, 48:1158-1163.
- Hilfiker-Kleiner D, Landmesser U, Drexler H. 2006. Molecular Mechanisms in Heart Failure: Focus on Cardiac Hypertrophy, Inflammation, Angiogenesis, and Apoptosis. *J Am Coll Cardiol*, 48 (9):A56-A66.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 348 (7):593-600.
- Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. 1993. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol*, 22 (4 Suppl A):6A-13A.
- Hoetzer GL, MacEneaney OJ, Irmiger HM, Keith R, Van Guilder GP, Stauffer BL, DeSouza CA. 2007. Gender differences in circulating endothelial progenitor cell colony-forming capacity and migratory activity in middle-aged adults. *Am J Cardiol*, 99 (1):46-48.
- Honold J, Lehmann R, Heeschen C, Walter DH, Assmus B, Sasaki K, Martin H, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. 2006. Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (10):2238-2243.
- Hoppe UC. 2007. [Guideline satisfying therapy for chronic heart failure]. *Internist (Berl)*, 48 (9):929-937.
- Horn PA, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl V, Voliotis D. 1999. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 93 (4):1435-1437.
- Hristov M, Weber C. 2004. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*, 8 (4):498-508.
- Hristov M, Erl W, Weber PC. 2003. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med*, 13 (5):201-206.
- Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q. 2004. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest*, 113 (9):1258-1265.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. 2004. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their

- different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24 (2):288-293.
- Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. 2005. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*, 106 (5):1525-1531.
- Inoue T, Sata M, Hikichi Y, Sohma R, Fukuda D, Uchida T, Shimizu M, Komoda H, Node K. 2007. Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. *Circulation*, 115 (5):553-561.
- Iversen PO, Woldbaek PR, Tonnessen T, Christensen G. 2002. Decreased hematopoiesis in bone marrow of mice with congestive heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282 (1):R166-172.
- Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T, Losordo DW. 2003. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation*, 108 (25):3115-3121.
- Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T. 2006. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation*, 113 (10):1311-1325.
- Kalka C, Asahara T, Krone W, Isner JM. 2000. [Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization]. *Herz*, 25 (6):611-622.
- Kannel WB, Cupples A. 1988. Epidemiology and risk profile of cardiac failure. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2 Suppl 1:387-395.
- Katz SD. 1997. Mechanisms and implications of endothelial dysfunction in congestive heart failure. *Curr Opin Cardiol*, 12 (3):259-264.
- Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Zak V, Asahara T, Losordo DW. 2006. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*, 114 (20):2163-2169.
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. 1989. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 246 (4935):1309-1312.
- Kempf T, Drexler H, Wollert KC. 2007. [Pathophysiology of heart failure]. *Internist (Berl)*, 48 (9):899-908.
- Khan SS, Solomon MA, McCoy JP, Jr. 2005. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 64 (1):1-8.
- Kinnaird T, Stabile E, Zbinden S, Burnett MS, Epstein SE. 2008. Cardiovascular risk factors impair native collateral development and may impair efficacy of therapeutic interventions. *Cardiovasc Res*, 78 (2):257-264.
- Kissel CK, Lehmann R, Assmus B, Aicher A, Honold J, Fischer-Rasokat U, Heeschen C, Spyridopoulos I, Dimmeler S, Zeiher AM. 2007. Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 49 (24):2341-2349.
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. 2001. Neovascularization of ischemic myocardium by

- human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 7 (4):430-436.
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. 1996. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87 (1):1-13.
- Lambiase PD, Edwards RJ, Anthopoulos P, Rahman S, Meng YG, Bucknall CA, Redwood SR, Pearson JD, Marber MS. 2004. Circulating humoral factors and endothelial progenitor cells in patients with differing coronary collateral support. *Circulation*, 109 (24):2986-2992.
- Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Mische E, Bohm M, Nickenig G. 2004. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*, 109 (2):220-226.
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. 1990. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*, 323 (4):236-241.
- Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Kowalska MA, Gewirtz AM, Emerson SG, Ratajczak MZ. 2001. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*, 97 (10):3075-3085.
- Mann DL, Bristow MR. 2005. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*, 111 (21):2837-2849.
- Mazhari R, Hare JM. 2007. Advances in cell-based therapy for structural heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*, 49 (6):387-395.
- McMurray JJ, Pfeffer MA. 2005. Heart failure. *Lancet*, 365 (9474):1877-1889.
- Mehta PA, Dubrey SW. 2008. High output heart failure. *Qjm*,
- Michowitz Y, Goldstein E, Wexler D, Sheps D, Keren G, George J. 2007. Circulating endothelial progenitor cells and clinical outcome in patients with congestive heart failure. *Heart*, 93 (9):1046-1050.
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. 1997. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 90 (12):5013-5021.
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. 2004. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*, 110 (3):349-355.
- Morita H, Seidman J, Seidman CE. 2005. Genetic causes of human heart failure. *J Clin Invest*, 115 (3):518-526.
- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. 2000. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 105 (11):1527-1536.
- Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Nishimura Y, Tomizawa H, Ichida M, Eizawa T, Muroi K, Ikeda U, Shimada K. 2007. Circulating endothelial progenitor cells in congestive heart failure. *Int J Cardiol*, 119 (3):344-348.
- Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, Ishii M, Morita Y, Kubota R, Yokouchi K, Imai H, Harada M, Osanai H, Kondo T, Murohara T. 2006. The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Circulation*, 114 (1 Suppl):I114-119.
- Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. 2006. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*, 355 (3):251-259.
- Parsi R, Parsi E. 2001. Herzinsuffizienz. In: Parsi R, Rarsi E, Hrsg. *Kardiologie, Angiologie*. 1te Aufl. München, Jena: Urban & Fischer, 658-685.

- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95 (3):952-958.
- Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. 2003. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, 107 (18):2294-2302.
- Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, McCoy JP, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF, Finkel T, Cannon RO, 3rd. 2005. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2):296-301.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. 2006. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*, 20 (11):1915-1924.
- Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA. 2003. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*, 108 (4):457-463.
- Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. 2003. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 107 (8):1164-1169.
- Rothe G. 2007. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, Hrsg. *Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 1te Aufl. Basel: Karger, 27-70.
- Rotheram EB, Jr. 1989. High output congestive heart failure in septic shock. *Chest*, 95 (6):1367-1368.
- Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. 2003. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*, 101 (1):168-172.
- Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K, Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkentin JD, Zou Y, Komuro I. 2007. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*, 446 (7134):444-448.
- Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. 2006. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355 (12):1210-1221.
- Schatteman G. 2005. Are circulating CD133+ cells biomarkers of vascular disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2):270-271.
- Scheffold T, Binner P, Erdmann J, Schunkert H. 2005. [Hypertrophic cardiomyopathy]. *Herz*, 30 (6):550-557.
- Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, Simm A. 2003. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*, 42 (12):2073-2080.
- Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. 2005. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*, 111 (22):2981-2987.

- Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. 2007. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 28 (6):766-772.
- Semenza GL. 2003. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med*, 54:17-28.
- Sengenès C, Miranville A, Maumus M, de Barros S, Busse R, Bouloumie A. 2007. Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31- progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. *Stem Cells*, 25 (9):2269-2276.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219 (4587):983-985.
- Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF. 1993. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*, 12 (3-4):303-324.
- Shaffer RG, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS, Mohler ER, 3rd. 2006. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry B Clin Cytom*, 70 (2):56-62.
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. 1998. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92 (2):362-367.
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. 2001. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103 (23):2776-2779.
- Siegenthaler W. 2001. Herz und Koronarkreislauf. In: Siegenthaler W, Hrsg. *Klinische Pathophysiologie*. 8te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 630-633.
- Silva GV, Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Assad JA, Vaughn WK, Mesquita CT, Belem L, Carvalho AC, Dohmann HJ, Barroso do Amaral E, Coutinho J, Branco R, Oliveira E, Willerson JT. 2004. Catheter-based transendocardial delivery of autologous bone-marrow-derived mononuclear cells in patients listed for heart transplantation. *Tex Heart Inst J*, 31 (3):214-219.
- Smith CJ, Sun D, Hoegler C, Roth BS, Zhang X, Zhao G, Xu XB, Kobari Y, Pritchard K, Jr., Sessa WC, Hintze TH. 1996. Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circ Res*, 78 (1):58-64.
- Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E. 1995. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol*, 15 (10):5363-5368.
- Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. 2005. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 181 (2):305-310.
- Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, Bigalke B, Mueller I, Schumm M, Schaefer I, Seizer P, Kraemer BF, Siegel-Axel D, May AE, Lindemann S, Gawaz M. 2008. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation*, 117 (2):206-215.
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. 2002. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 106 (15):1913-1918.

- Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickenig G. 2003. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*, 107 (24):3059-3065.
- Stump MM, Jordan GL, Jr., Debakey ME, Halpert B. 1963. Endothelium Grown from Circulating Blood on Isolated Intravascular Dacron Hub. *Am J Pathol*, 43:361-367.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Wagner M, Isner JM, Asahara T. 1999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 5 (4):434-438.
- Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. 2002. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 106 (22):2781-2786.
- Thum T, Fraccarollo D, Thum S, Schultheiss M, Daiber A, Wenzel P, Munzel T, Ertl G, Bauersachs J. 2007. Differential effects of organic nitrates on endothelial progenitor cells are determined by oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (4):748-754.
- Urbich C, Dimmeler S. 2004. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, 95 (4):343-353.
- Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. 2005a. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*, 39 (5):733-742.
- Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, Walter DH, Bruhl T, Potente M, Hofmann WK, de Vos S, Zeiher AM, Dimmeler S. 2005b. FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *Faseb J*, 19 (8):974-976.
- Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. 2004. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*, 110 (10):1209-1212.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. 2001a. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*, 103 (24):2885-2890.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. 2001b. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 89 (1):E1-7.
- Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ. 2004. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*, 109 (17):2058-2067.
- Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. 2002. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 105 (25):3017-3024.
- Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G. 2006. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circ Res*, 99 (8):e74-83.

- Watanabe H, Okamura K, Chinushi M, Furushima H, Tanabe Y, Kodama M, Aizawa Y. 2008. Clinical characteristics, treatment, and outcome of tachycardia induced cardiomyopathy. *Int Heart J*, 49 (1):39-47.
- Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. 2003. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*, 93 (2):e17-24.
- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. 2005. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 353 (10):999-1007.
- White M, Ducharme A, Ibrahim R, Whittom L, Lavoie J, Guertin MC, Racine N, He Y, Yao G, Rouleau JL, Schiffrin EL, Touyz RM. 2006. Increased systemic inflammation and oxidative stress in patients with worsening congestive heart failure: improvement after short-term inotropic support. *Clin Sci (Lond)*, 110 (4):483-489.
- Wollert KC, Drexler H. 2005. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res*, 96 (2):151-163.
- Wu X, Lensch MW, Wylie-Sears J, Daley GQ, Bischoff J. 2007. Hemogenic endothelial progenitor cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*, 25 (11):2770-2776.
- Wu X, Rabkin-Aikawa E, Guleserian KJ, Perry TE, Masuda Y, Sutherland FW, Schoen FJ, Mayer JE, Jr., Bischoff J. 2004. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287 (2):H480-487.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 90 (12):5002-5012.
- Yoo ES, Lee KE, Seo JW, Yoo EH, Lee MA, Im SA, Mun YC, Lee SN, Huh JW, Kim MJ, Jo DY, Ahn JY, Lee SM, Chung WS, Kim JH, Seong CM. 2003. Adherent cells generated during long-term culture of human umbilical cord blood CD34+ cells have characteristics of endothelial cells and beneficial effect on cord blood ex vivo expansion. *Stem Cells*, 21 (2):228-235.
- Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. 2008. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*, 78 (3):413-421.
- Zeleniuch-Jacquotte A, Akhmedkhanov A, Kato I, Koenig KL, Shore RE, Kim MY, Levitz M, Mittal KR, Raju U, Banerjee S, Toniolo P. 2001. Postmenopausal endogenous oestrogens and risk of endometrial cancer: results of a prospective study. *Br J Cancer*, 84 (7):975-981.
- Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergun S. 2006. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development*, 133 (8):1543-1551.

9 Anhang

9.1 Veröffentlichte wissenschaftliche Arbeiten

Publikationen

Jung C, Fischer N, Fritzenwanger M, Thude H, Ferrari M, Fabris M, Brehm BR, Barz D, Figulla HR. 2008. Endothelial progenitor cells in adolescents: impact of overweight, age, smoking, sport and cytokines in younger age. Clin Res Cardiol. [im Druck].

Fritzenwanger M, Lorenz F, Jung C, Fabris M, Thude H, Barz D, Figulla HR. 2009. Differential number of CD34+, CD133+ and CD34+/CD133+ cells in peripheral blood of patients with congestive heart failure. Eur J MedRes. 14:1-5.

9.2 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. habil. Dagmar Barz für die freundliche Überlassung des Themas und die Ermöglichung dieser Dissertation, Ihrer wissenschaftlichen Unterstützung sowie der Durchsicht dieser Arbeit und der motivierenden Betreuung während des gesamten Zeitraumes der Promotion.

Weiterhin danke ich besonders Herrn Dr. rer. nat. Hansjörg Thude für die wissenschaftliche und technische Einführung in die Methode der Durchflusszytometrie, für die fachkundige und tatkräftige Betreuung zu jeder Zeit sowie für die Unterstützung und die wertvollen Hinweise bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich Frau Dr. Kummer von der Blutbank, Herrn Oberarzt Dr. med. Thomas Lorenzen von der Blutspendeeinrichtung des Institutes für Transfusionsmedizin sowie dem Team des HLA-Labors für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Rüdiger Vollandt und Frau Claudia Hemmelmann für die fachkundige Unterstützung bei der Einarbeitung in die Statistik und in das SPSS-Programm.

An dieser Stelle danke ich meiner lieben Familie und ganz besonders meinen Eltern dafür, dass sie mich jahrelang auf meinem Weg unterstützt und begleitet haben und mir immer die Motivation, den nötigen Ansporn und den Ehrgeiz gaben, Ziele in Angriff zu nehmen und zu erreichen. Ein besonderer Dank gilt Frau Evelyn Fabris für die sehr hilfreiche und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ebenso danke ich ganz herzlich Herrn Markus Stephan für seine ständige geduldige Hilfsbereitschaft sowie für seine vielfältige und vielfache Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion und darüber hinaus.

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. med. habil. D. Barz, Herr Dr. rer. nat. H. Thude und Herr Dr. med. N. Fiedler,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bad Langensalza, den 23. Januar 2009

Marlen Fabris